

修 士 論 文 の 和 文 要 旨

研究科・専攻	電気通信大学大学院 情報理工学研究科 基盤理工学専攻 博士前期課程		
氏 名	木村 紗与理	学籍番号	1933041
論 文 題 目	細胞内イノシトール三リン酸濃度制御のための光活性化型酵素の開発		
要 旨			
【背景・目的】			
<p>イノシトール三リン酸（IP₃）は、細胞内 Ca²⁺濃度の調節の役割を担う因子として様々な細胞機能の調節に関わる重要な細胞内シグナル分子である。哺乳類卵では、受精時に精子から移行した IP₃ 産生酵素ホスホリパーゼ Cζ（PLCζ）の働きによって IP₃ が産生され、卵細胞内 Ca²⁺濃度の反復性上昇（Ca²⁺振動）が誘発される結果、胚発生がトリガーされる。細胞内 IP₃ 濃度を任意に増減させることができる方法が確立されれば、卵細胞に限らず種々の体細胞での IP₃ の生理的役割や調節機構に関する研究における強力な実験手段となる。本研究では、生細胞内の IP₃ 濃度を光によって制御する手法の確立を目指し、PLCζ に光感受性タンパク質である Magnet やフィトクローム B（PhyB）を組み合わせることで光依存性を付与し、光照射によって IP₃ 濃度上昇を誘発することができる分子ツールの作成を試みた。</p>			
【方法】			
<p>野生型 PLCζ、または N 末端の 4 つの EF ハンドを順次欠損させた変異体の両端に、青色光依存的にヘテロダイマーを形成する Magnet（pMag, nMag）を結合した cDNA を作成し、合成した cRNA をマウス成熟卵に注入してタンパク質を発現させた。蛍光性 Ca²⁺プローブ fura-2 を用いて細胞内 Ca²⁺濃度の経時変化を測定し、青色光照射が Ca²⁺振動に与える影響の有無を観察した。一方、PhyB に膜移行配列（Kras）を付与したものと、PhyB 結合タンパク質 PIF6 と PLCζ とを結合したものも作成し、共発現させた卵において赤色光照射時と遠赤色光照射時の Ca²⁺振動の様子を比較した。</p>			
【結果・考察】			
<p>pMag-PLCζ-nMag は卵に発現させただけで Ca²⁺振動を誘発し、また青色光を照射しても Ca²⁺スパイク頻度に有意な変化は見られなかった。EF ハンド欠損変異体を用いた場合は野生型に比べ活性は低下し、EF ハンドを 3 つ以上欠損させたものを高濃度に発現させても Ca²⁺振動は誘発されず、また青色光照射によっても活性の増大は認められなかった。このことから、両端に付与した Magnet の結合・解離は PLCζ の構造に影響しないことが示唆された。一方 PhyB/PIF6 を用いた実験では、Kras を付加した PhyB は卵の細胞膜に局在すること、また同時に発現させた PIF6 は赤色光/遠赤色光照射依存的に細胞質から細胞膜へ可逆的に移行することが確認できた。しかし、PhyB-Kras と PIF6-PLCζ を共発現させた卵では、光照射依存的な Ca²⁺振動誘発活性の変化は見られなかった。今後は PhyB-PIF6 複合体と PLCζ の細胞膜に対する立体配置を精査して、分子設計を再検討する必要がある。</p>			

令和 2 年度 電気通信大学 修士論文

細胞内イノシトール三リン酸
濃度制御のための光活性化型酵素の開発

学籍番号 1933041

氏 名 木村 紗与理

基盤理工学専攻 化学生命工学プログラム

主任指導教員 白川 英樹 准教授

指 導 教 員 松田 信爾 准教授

提 出 日 令和 3 年 1 月 25 日

目次

第1章 序章	3
1.1 カルシウムシグナリングとイノシトールリン酸	3
1.1.1 細胞内 Ca^{2+} の機能と調節機構	3
1.1.2 イノシトールリン酸の代謝経路と細胞調節機能	5
1.1.3 哺乳類卵受精時の $\text{Ca}^{2+}/\text{IP}_3$ シグナリング	5
1.2 IP_3 合成酵素 PLC	7
1.2.1 PLC の構造と機能	7
1.2.2 $\text{PLC}\zeta$ の特性	9
1.3 光遺伝学 (オプトジェネティクス)	9
1.3.1 光を用いた細胞応答の制御	9
1.3.2 光受容タンパク質 Magnet	11
1.3.3 光受容タンパク質 PhyB /PIF6	13
1.4 本研究の目的と概要	15
第2章 実験方法	16
2.1 膜移行配列	19
2.2 光受容体を用いた欠損型 $\text{PLC}\zeta$ の活性化機構	19
2.3 pMag-h $\text{PLC}\zeta$ [35,68,103,147-608]-nMag-EGFP-CAAX の作製	22
2.3.1 翻訳領域の増幅	22
2.3.2 制限酵素処理	22
2.3.3 プラスミドベクターへサブクローニング	24
2.3.4 コロニーPCR による確認	24
2.3.5 プラスミド DNA の精製	24
2.4 変異体 PIF6-mYFP-m $\text{PLC}\zeta$, PIF6-mYFP-h $\text{PLC}\zeta$, PIF6-mYFP-m $\text{PLC}\zeta/\Delta\text{C2}$, PIF6-mYFP-h $\text{PLC}\zeta/\Delta\text{C2}$ の作製	25
2.4.1 翻訳領域の増幅から DNA 精製	25
2.5 変異体 PhyB-mCherry-PHD, PIF6-mYFP-m $\text{PLC}\zeta/\delta\text{1C2}$ の作製	25
2.5.1 翻訳領域の増幅 (インフュージョン)	27
2.5.2 インフュージョン	27
2.5.3 プラスミドベクターへサブクローニングから DNA 精製	27
2.6 RNA の合成	29
2.7 変異体 RNA のマウス卵細胞での Ca^{2+} オシレーション誘発活性の観察	29
2.7.1 ddY メスマウスの成熟卵の採取	29

2.7.2	マイクロインジェクション	30
2.7.3	前培養	30
2.7.4	蛍光顕微鏡による観察	31
2.7.5	蛍光測定	31
2.7.6	解析	34
第3章	実験結果	35
3.1	pMagFast2, nMagHigh1 結合型 PLC ζ の光活性評価	35
3.2	PhyB/PIF6 結合型の PLC ζ の光活性評価	38
3.2.1	PhyB/PIF6 の膜移行評価	38
3.2.2	PhyB-mCherry-Kras, PhyB-mCherry-PHD, PIF6 結合型 PLC ζ の光活性評価	38
第4章	考察と今後の展望	44
	謝辞	46
	参考文献	47
	付録	50

第1章 序章

1.1 カルシウムシグナリングとイノシトールリン酸

哺乳類の基本的な必須元素であるカルシウムは骨や歯だけでなく、血液や筋肉などに存在しており、様々な働きをすることがわかっている。カルシウムは生体内で2価の Ca^{2+} の状態で、細胞の刺激応答反応において極めて重要な役割を担っており、細胞の増殖や分化、エネルギー産生やアポトーシスなどに関与する細胞内メッセンジャーである。また細胞内の Ca^{2+} 濃度を調節する因子としてイノシトールリン酸 (IP) がある。イノシトールリン酸はイノシトールの水酸基がリン酸化したものの総称であり、リン酸化した水酸基の数から $\text{IP}_1 \sim \text{IP}_6$ まで存在する。

1.1.1 細胞内 Ca^{2+} の機能と調節機構

通常、細胞質中の Ca^{2+} 濃度は非常に低く保たれており、細胞外からの応答に応じてカルシウム貯蔵庫である小胞体から細胞質中へと流出し、細胞質内の Ca^{2+} 濃度が急上昇する^[1]。この Ca^{2+} 濃度の急上昇が、細胞の形態、運動性、ホルモンや情報伝達物質の開口分泌、卵細胞の受精の制御など様々な反応過程の引き金となっていることが知られている。例えば、神経細胞では神経伝達因子のエキソサイトーシスや神経突起の伸展、筋細胞では筋収縮を引き起こしている。そして哺乳類の卵細胞は受精時に Ca^{2+} 濃度の一過性の急上昇が繰り返して起こる Ca^{2+} 振動という現象を起こし、受精卵の賦活化を引き起こしている (図 1.1)。 Ca^{2+} 振動は Ca^{2+} オシレーションと呼ぶこともできる。細胞質中の Ca^{2+} 濃度は厳密に保たれており、濃度の急上昇の後はずっと戻るように Ca^{2+} 濃度を低下させる機構が働き、静止時の Ca^{2+} 濃度に落ち着く。

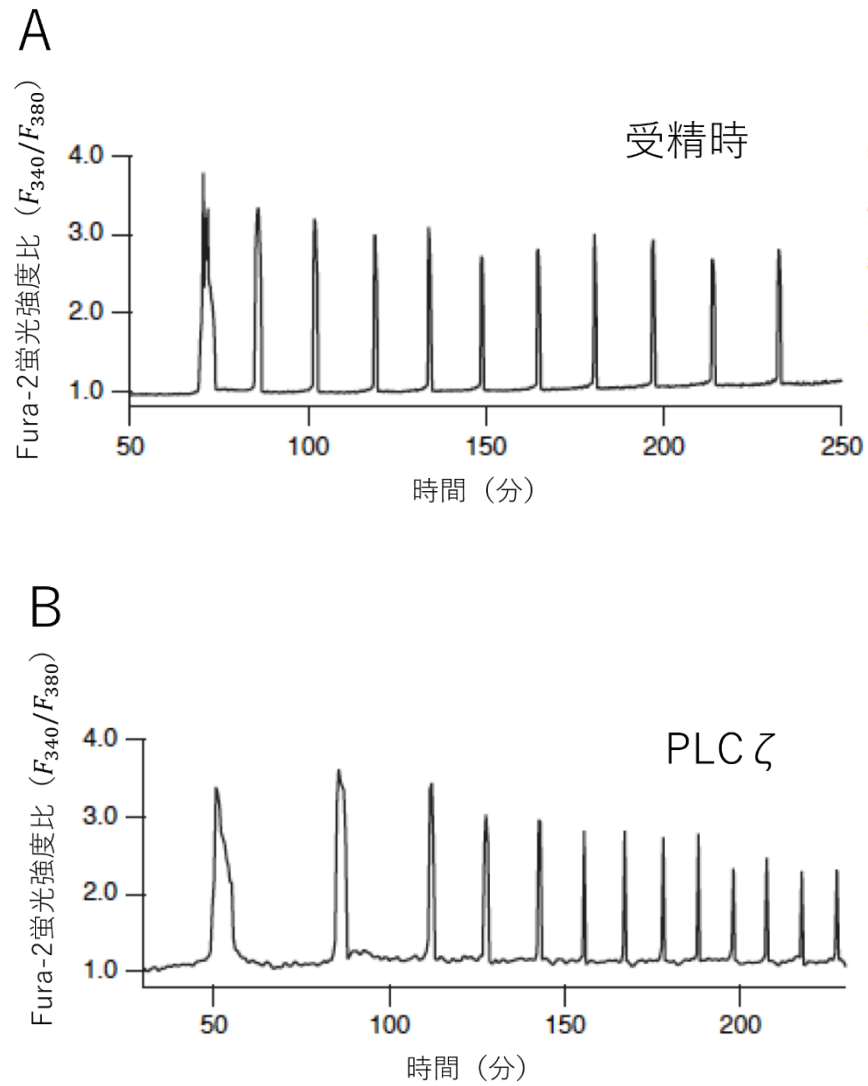


図 1.1 Ca^{2+} オシレーション (文献^[2]より改変)

(A) マウス卵で見られる受精時の Ca^{2+} オシレーション。卵細胞内の fura-2 の蛍光強度比から Ca^{2+} 濃度の反復的な上昇が見られる。(B) PLC ζ の RNA 注入後の Ca^{2+} オシレーション。受精時と比較して、PLC ζ の RNA を注入した卵細胞においても受精時と同様な Ca^{2+} 濃度の反復的な上昇が見られる。

1.1.2 イノシトールリン酸の代謝経路と細胞調節機能

イノシトールリン酸は細胞外からのシグナル分子が細胞膜上の受容体に結合すると細胞膜を構成しているイノシトールリン酸脂質がホスホリパーゼ C (PLC) によって加水分解を受ける。イノシトールリン酸脂質にはホスファチジルイノシトール (PI)、ホスファチジルイノシトール 4-リン酸 (PIP)、ホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸 (PIP₂) の 3 つがあり、これらが PLC による加水分解でそれぞれイノシトール 1-リン酸 (IP₁)、イノシトール 1,4-二リン酸 (IP₂)、イノシトール 1,4,5-三リン酸 (IP₃) が産生される。そしてこれらはリン酸の結合と分解によって例えば IP₃ から IP₄、IP₃ から IP₂ へと変化する代謝経路がある^[3]。さらにイノシトールリン酸の中でも IP₃ は生体内の情報伝達物質として重要な役割を果たしている。IP₃ は小胞体のカルシウムチャネルに結合し、小胞体内 Ca²⁺ の細胞質中への放出を動員する。細胞質中の Ca²⁺ 濃度上昇は様々な生理現象の活性化につながるため、イノシトールリン酸の代謝経路は非常に重要な役割を担っている。

1.1.3 哺乳類卵受精時の Ca²⁺/IP₃ シグナリング

受精時における Ca²⁺ オシレーションは、ホスホリパーゼ C ζ (PLC ζ) という精子に特異的に発現している酵素が誘導因子である^[4]。精子と卵が融合すると、卵細胞の中に精子内の PLC ζ が移行する。PLC ζ の移行により、卵細胞膜に存在するイノシトールリン酸脂質である PIP₂ が PLC ζ によって加水分解され、IP₃ と、ジアシルグリセロール (DAG) が産出される。この IP₃ が小胞体の Ca²⁺ チャネルである IP₃ 受容体に結合し、小胞体内の Ca²⁺ を細胞質中に放出させることで Ca²⁺ オシレーションが引き起こされる^{[5][6]} (図 1.2)。

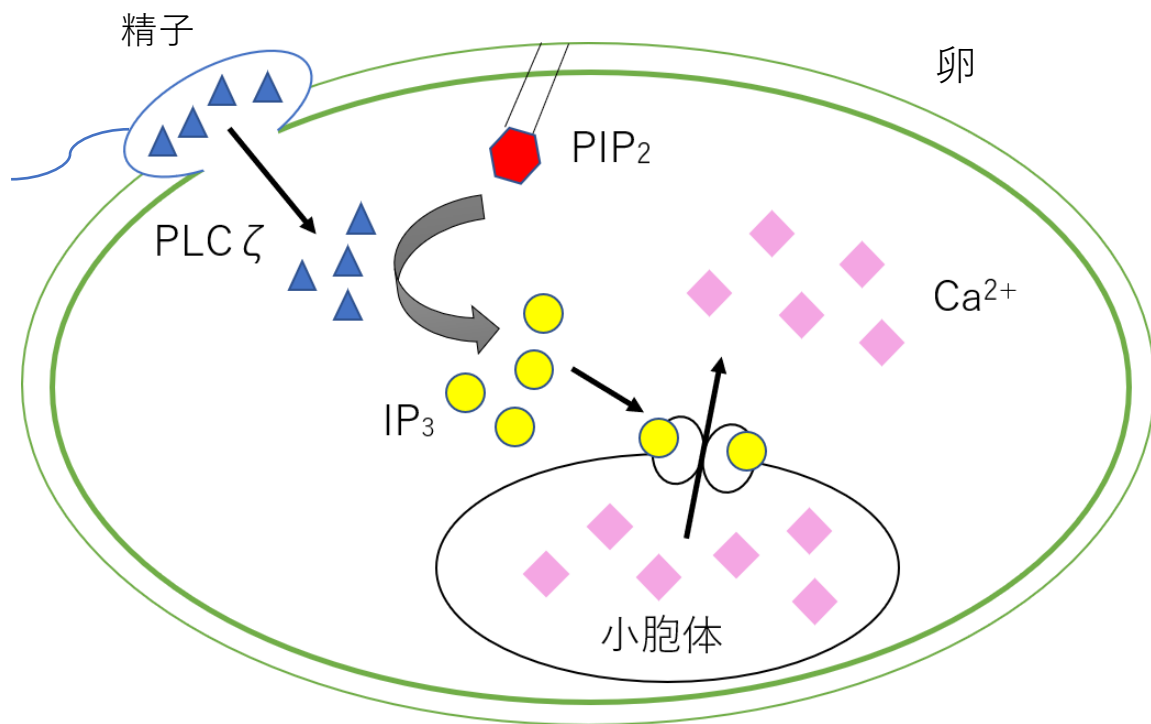


図 1.2 Ca^{2+} オシレーションの発生機構

精子が卵細胞と融合すると、精子から精子特異的なタンパク質である $PLC\zeta$ によって PIP_2 が加水分解されて、 IP_3 が産生される。 IP_3 が小胞体にある IP_3 受容体に結合することによって小胞体から細胞質への Ca^{2+} の放出を引き起こされる。また Ca^{2+} ポンプなどによって Ca^{2+} が細胞外へ放出され、卵細胞質内の Ca^{2+} 濃度は元のレベルに戻る。このようにして Ca^{2+} オシレーションが誘発される。

1.2 IP₃ 合成酵素 PLC

PLC はイノシトールリン脂質の代謝経路においてセカンドメッセンジャーを産生する酵素であり、特異的な基質として細胞膜に局在する PIP₂ を加水分解し IP₃ と DAG を産生する。IP₃ は IP₃ 受容体を介した小胞体からの Ca²⁺ 流出、DAG はプロテインキナーゼ C (PKC) や TRPC チャネルの活性化を引き起こす^[7]。これらはリン脂質由来であるのでとくに脂質性シグナル伝達分子とも呼ばれている。哺乳動物では PLC は構造的に β 、 γ 、 δ 、 ϵ 、 η 、 ζ の 6 つサブタイプに分類され、それぞれ異なる構造を持っている。さらにそれぞれのサブタイプは $\beta 1 \sim \beta 4$ 、 $\gamma 1$ と $\gamma 2$ 、 $\delta 1$ と $\delta 3$ と $\delta 4$ 、 $\epsilon 1$ と $\epsilon 2$ 、 $\eta 1$ と $\eta 2$ 、 $\zeta 1$ のアイソザイムが存在する^[7]。

1.2.1 PLC の構造と機能

PLC の 6 つのタイプの構造が図 1.3 である。すべてに共通して EF、X、Y、C2 ドメインが存在しており、この 4 つのドメインのみを持つ最も短いものが PLC ζ である^[8]。EF ハンドドメインと C2 ドメインは Ca²⁺ 結合能を持ち、X-Y 触媒ドメインは酵素活性や PIP₂ と結合する役割を持っている。そして PLC ζ を除いた他のタイプでは共通して PH ドメインを持っている。PH ドメインは細胞膜直下の小胞のリン脂質に結合する機能をもっている。RA ドメインは Ras タンパク質に結合し、RasGEF は Ras タンパク質のグアニンヌクレオチド交換因子ドメインである。また PLC のそれぞれのタイプは異なる活性化機構をもっている^[9]。 β タイプは G タンパク質共役型受容体、 ϵ タイプは低分子量 G タンパク質の Ras や Rho、 γ タイプは、SH2 ドメインを介した受容体型チロシンキナーゼによって活性化される。 δ と ζ タイプは細胞内 Ca²⁺ 濃度の上昇によって活性化され、 η タイプも同じ機構であると考えられている。

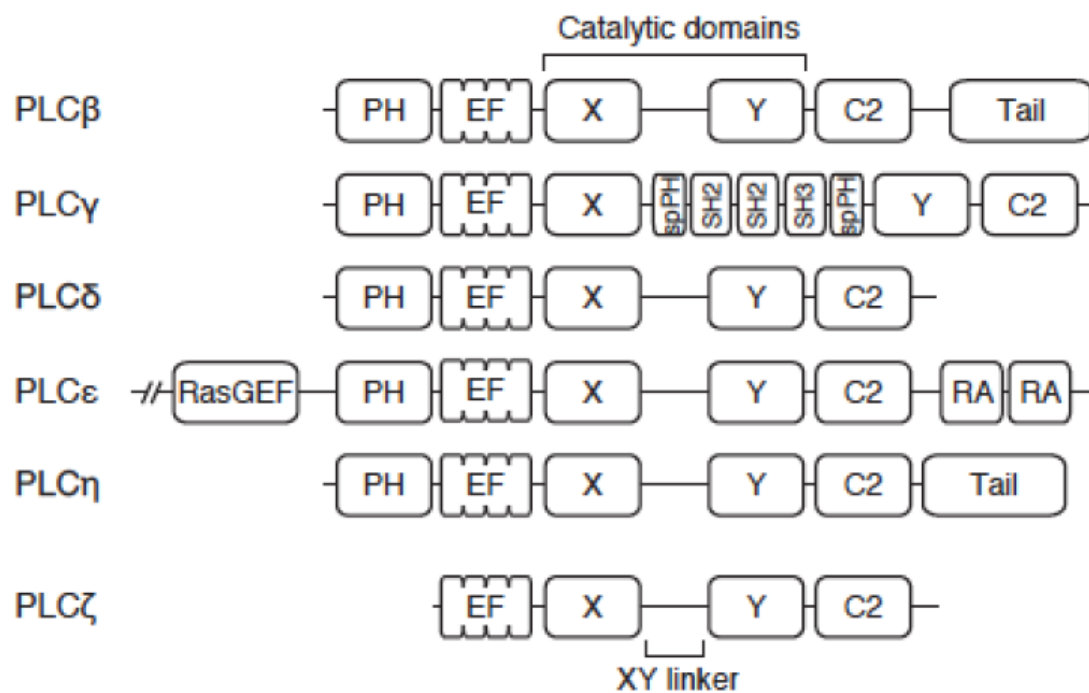


図 1.3 PLC のドメイン構造 (文献 [2] より引用)

すべてに共通して EF、X、Y、C2 ドメインを持ち、PLC ζ だけが PH ドメインを持たない最も短い構造である。

1.2.2 PLC ζ の特性

PLC ζ は精子特異的に発現しているタンパク質であり、卵細胞内の Ca^{2+} オシレーションと卵細胞の賦活化を引き起こす。PLC ζ のアイソザイムである PLC $\delta 1$ の 3 次元構造の結晶解析から、X-Y リンカー領域は図 1.4 のように折りたたまれ、C2 ドメインが広域にわたって EF ドメインと接触していると考えられている。この折りたたまれた X-Y 触媒ドメイン部分に PIP_2 が結合し、加水分解が行われることで Ca^{2+} オシレーションが起きる。このように、PLC ζ の折りたたまれた構造が Ca^{2+} オシレーションを引き起こすのに重要な役割を持っていると考えられており、EF ハンドドメインや C2 ドメインを欠損させた場合における PLC ζ の酵素活性の研究から、その重要性が明らかになっている^[10]。また先行研究から、マウス PLC ζ よりヒト PLC ζ のほうが、より強い Ca^{2+} オシレーション誘発活性があることが明らかとなっている^[11]。

1.3 光遺伝学 (オプトジェネティクス)

光遺伝学とは、光受容体を目的細胞で発現させ、光制御する技術である。光受容体とは、ある帯域の光を感受することで構造変化し結合を起こすタンパク質のことである。光による制御は、細胞毒性が低く、任意のタイミングで目的細胞の生命機能を制御できるというメリットがある。またウイルスベクターによる遺伝子導入を行えば、生命活動中の動物で特定の細胞がどのように働いているのかを観察することが可能である。

1.3.1 光を用いた細胞応答の制御

光受容体は光応答する波長や速度が異なる複数のものが存在するが、初期に発見された光受容体はチャネルロドプシン 2 (ChR2) である。ChR2 は緑藻クラミドモナスから発見

A



B

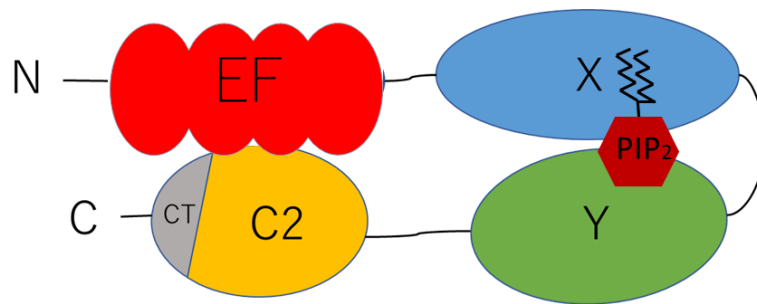


図 1.4 PLC ζ のドメイン構造と位置関係

(A) PLC ζ のドメイン構造。PLC のアイソザイムの中で最も短い。(B) PLC ζ のドメイン間の位置関係。X-Y リンカー部分が折りたたまれることで X ドメインと Y ドメインが近づき、PIP₂ が結合する。C 末端の CT 部分は構造上は C2 ドメインの一部だが、アミノ酸配列のホモロジーからドメインを区切ると、C2 ドメインと CT 部分で区切られる。

され、青色光（480 nm）によって直接的に Na^+ や K^+ の陽イオンを透過させるイオンチャネルである^[12]。ChR2 は 7 回膜貫通ドメインを持ち、レチナールを色素団として用いている。レチナールが青色の光子を吸収するとオールトランス型から 13 シス型に変化することで ChR2 の構造変化を引き起こし、陽イオンが透過する。この光受容体 ChR2 は多くの活用例があり、神経細胞に発現させて神経回路のマッピングなどに用いられている^[13]。

他の光受容体として LOV2 ドメインがある。植物は光合成や葉の光定位運動、気孔の開閉など光受容によってさまざまな生理反応をおこすが、植物性の光応答タンパク質の 1 つにフォトトロピンがある。フォトトロピンはシロイヌナズナで発見され、N 末端に青色光受容ドメインである Light, Oxygen, or Voltage domain (LOV2 ドメイン) を持つ^[14]。暗室状態のとき、LOV2 ドメインはフォトトロピンの C 末端にある $\text{J}\alpha$ ヘリックス (carboxy-terminal helical extension) と相互作用する。LOV2 ドメインはその構造内に色素団としてフラビンモノヌクレオチド (FMN) を含む。FMN が青色光 (430 nm) を吸収すると LOV2 が FMN と結合して LOV2 ドメインの構造変化によって $\text{J}\alpha$ ヘリックスがほどけフレキシブルな状態になる。LOV2 ドメインを用いることで、核内外への標的タンパク質の光依存性輸送が可能であるという活用例が報告されている^[15]。

光受容体は他にも様々な開発が行われており、本研究で用いた 2 種類の光受容体 Magnet と PhyB/PIF6 について説明する。

1.3.2 光受容タンパク質 Magnet

光受容体は植物の光合成に代表されるような、光受容を利用した反応を行い、成長や生命の維持に重要な機能を持っている。ViViD (VVD) はアカパンカビ由来の光受容体であり、青色光を受容して二量体化する性質を持っている^[16]。VVD の 3 次元構造が図 1.5 である。VVD は光受容体として十分な光活性を持つが、問題点としてホモ二量体を作ってしまう性

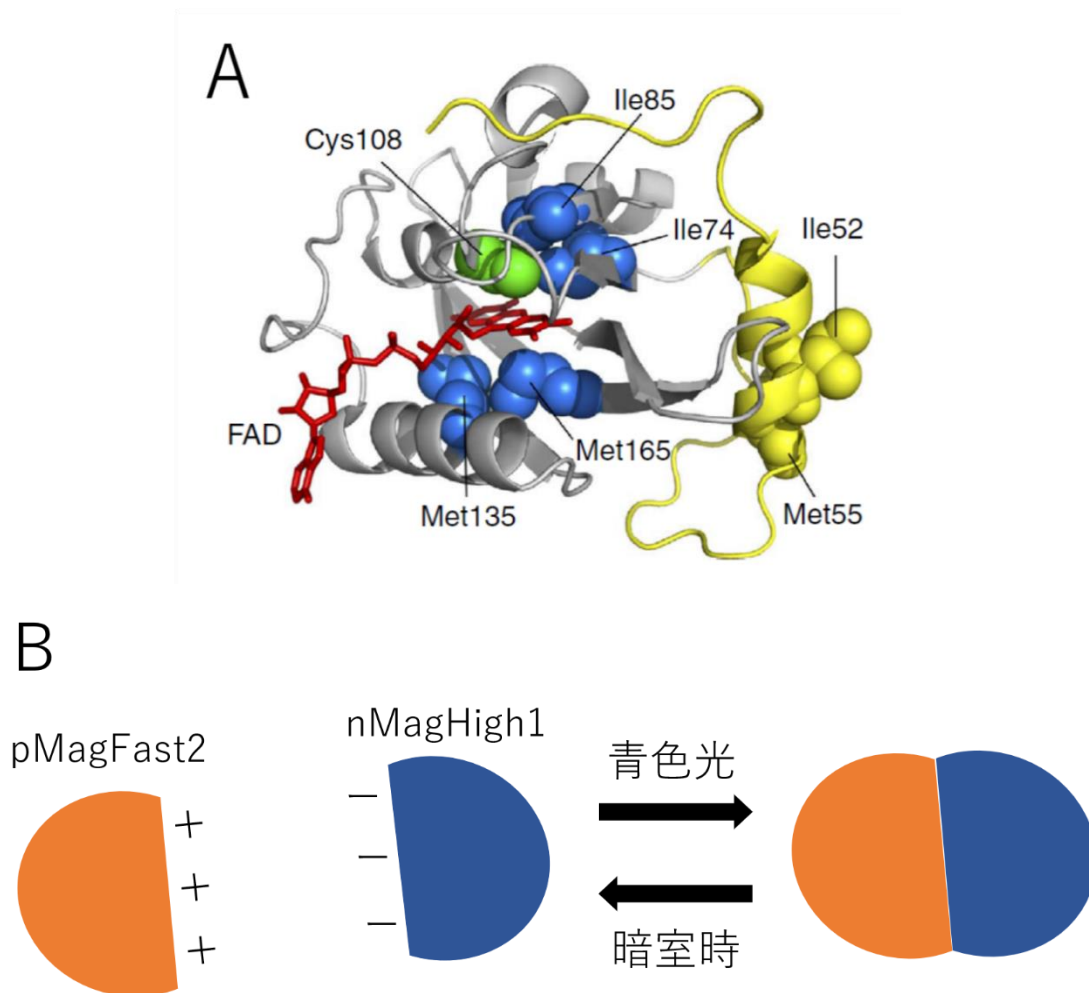


図 1.5 VVD の構造^[17]と pMagFast2, nMagHigh1 の光応答

(A) VVD の 3 次元構造。(B) pMagFast2, nMagHigh1 の光応答による構造変化。イソロイシンがアルギニンに置換され正に帯電した pMagFast2 と、アスパラギン酸に置換され負に帯電した nMagHigh1 が、青色光が照射されることで引き付けられヘテロ二量体を形成する。

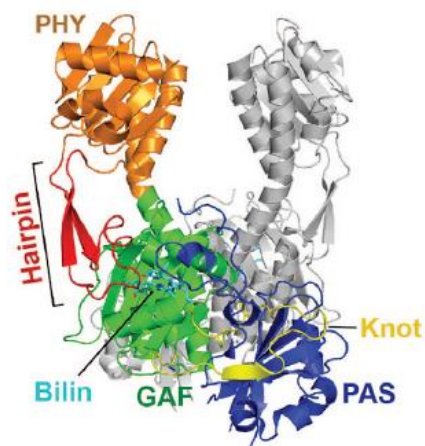
質がある。つまり、VVD を使って、タンパク質 A とタンパク質 B の相互作用を誘導したい場合、VVD が形成する二量体は、ヘテロ型である A-B 間の相互作用のみならず、ホモ型である A-A 間や B-B 間の相互作用を誘導してしまうのである。Kawano らのグループは、この問題の克服のため、VVD の二量体界面をタンパク質光学的アプローチに基づいて改変した^[16]。この改変により電荷的アミノ酸の静電相互作用を持たせたものが Magnet である。特に、イソロイシンをアルギニンアルギニンで置換したものが pMag、アスパラギン酸で置換したものが nMag である。さらに、pMag の 74 番目と 85 番目のイソロイシンをどちらもバリンに置換した pMagFast2 と、nMag の 135 番目と 165 番目のメチオニンをどちらもイソロイシンに置換した nMagHigh1 の組み合わせが、最も二量体形成効率を維持しながら単量体に戻る時間を数十秒から数分と短くすることができ、Kawano らにより新しい光受容体“pMagFast2”と“nMagHigh1”が開発された。この光受容タンパク質を pMagFast2 と nMagHigh1 を人為的に哺乳類細胞に導入することで特定の遺伝子発現シグナルが制御できることが分かっている^{[18][19]}。本研究では、これらの pMagFast2 と nMagHigh1 を用いて、pMagFast2, nMagHigh1 結合型 PLC γ を作製し、これをマウスの卵細胞に注入して Ca²⁺オシレーション誘発活性を評価した。

1.3.3 光受容タンパク質 PhyB /PIF6

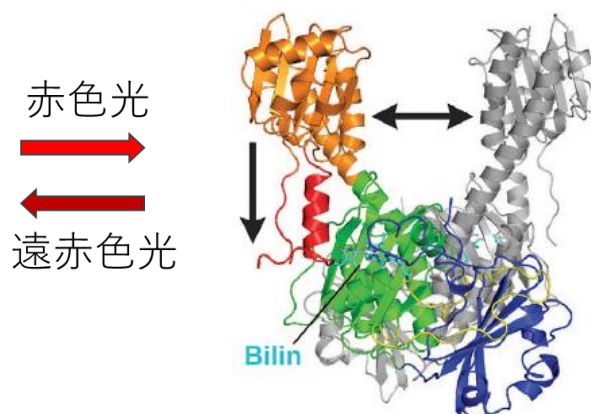
光受容タンパク質フィトクローム B (PhyB) はシロイヌナズナ由来の光受容タンパク質である。PhyB は補因子である発色団フィコシアノビルン (PCB) と結合している。PCB は色素タンパク質であり光エネルギーを吸収する働きがある。この結合によって PhyB が赤色光あるいは遠赤色光を吸収し、構造を変えるシステムが構築される。赤色光を吸収すると活性型 Pfr 型となり、遠赤色光を吸収すると不活性型 Pr 型となり、PhyB は光によって可逆的に変化させることができる (図 1.6)^[20]。そして活性型の Pfr 型の時のみ Phytochrome

A

Pr 型 (不活性型)



Pfr 型 (活性型)



B

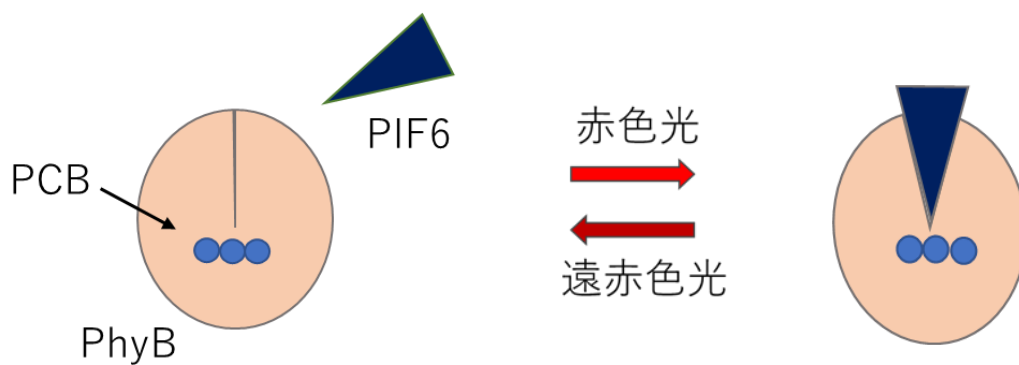


図 1.6 PhyB の構造と PhyB/PIF6 の光応答

(A) PhyB の 3 次元構造^[21]。(B) PhyB/PIF6 の光応答による構造変化。赤色光を吸収すると PhyB は構造変化を起こし PIF6 と結合する。そして可逆的に、遠赤色光を吸収すると PIF6 と解離を起こす。

Interaction Factor 6 (PIF6) のような下流シグナル伝達成分と結合し相互作用することができる。この光受容タンパク質である PhyB と PIF6 を人為的に哺乳類細胞に導入することで特定のタンパク質を制御できることが分かっている^[22]。本研究では、これらの PhyB と PIF6 を用いて、膜移行配列結合型 PhyB と PIF6 結合型 PLC ζ を作製し、これをマウスの卵細胞に注入して Ca²⁺オシレーション誘発活性を評価した。

1.4 本研究の目的と概要

本研究の目的は Ca²⁺濃度の上昇を光により制御する手法の確立である。細胞内の Ca²⁺濃度の変化は、生体内の様々な現象のトリガーであり、この濃度上昇の制御は、生物学の基礎研究において今後の発展に寄与する。Ca²⁺濃度上昇を誘起する手法として、光応答性の受容体である Magnet と PhyB/PIF6 の 2 種類を用いる。本研究の概要として、Magnet はヒト PLC ζ の両端に結合させ、PhyB/PIF6 については PIP₂ が局在している細胞膜に PhyB を結合、PIF6 と PLC ζ を結合させ、この光感受構造変化能を用いて、PLC ζ の酵素活性の光制御を目指す。また、光受容体による Ca²⁺濃度上昇の制御の可能性をさぐるため、酵素活性の落ちた欠損型 PLC ζ を用いて光受容体を結合させた変異体でも光制御を試みた。

第2章 実験方法

本研究では、pMagFast2,nMagHigh1 と PhyB/PIF6 の2種類の光受容体を用いて実験している。まず pMagFast2,nMagHigh1 を用いた実験について、ヒト PLC ζ の両端に pMagFast2,nMagHigh1 を結合した変異体 (pMag-hPLC ζ -nMag) の他に、EF ハンドドメインを 35,68,103,147 番目のアミノ酸で切り取った両端に pMagFast2 と nMagHigh1 を挿入した変異体 (pMag-hPLC ζ [35-608]-nMag、pMag-hPLC ζ [68-608]-nMag、pMag-hPLC ζ [103-608]-nMag、pMag-hPLC ζ [147-608]-nMag) の5種類を作製した。さらに、それぞれの変異体の C 末側に緑色蛍光タンパク質の改変体 EGFP (Encoding Green Fluorescent Protein) を付けて置くことで、変異体の RNA をマウスの成熟卵に注入したときに発現量を EGFP の蛍光強度から求めることができ、膜移行配列の CAAX も付けて置くことで、RNA が膜移行を起こし IP₃ 産生を起こしやすくした。各変異体のドメイン構造を図 2.1 に示した。

次に PhyB/PIF6 を用いた実験について、まず PhyB に赤色蛍光タンパク質の mCherry と膜移行配列の Kras を結合させた変異体 (PhyB-mCherry-Kras) を作製した。そして PIF6 に黄色蛍光タンパク質の mYFP とヒト PLC ζ およびマウス PLC ζ を結合させた変異体 (PIF6-mYFP-hPLC ζ 、PIF6-mYFP-mPLC ζ) の他に、C2 ドメイン欠損型 PLC ζ に置き換えた変異体 (PIF6-mYFP-hPLC ζ /ΔC2、PIF6-mYFP-mPLC ζ /ΔC2) の4種類を作製した。さらに PIP₂ 加水分解を効率よくするため、もう1つの膜移行配列 PHD を結合させた変異体 (PhyB-mCherry-PHD) と、C2 ドメインをラット PLC δ 1 の C2 ドメインに置換した変異体 (PIF6-mYFP-mPLC ζ /δ1C2) を作製した。各変異体のドメイン構造を図 2.2 に示した。

そして卵細胞を fura-2 で染色することで fura-2 蛍光強度比から、それぞれの変異体が Ca²⁺オシレーション誘発活性を有しているかを評価した。

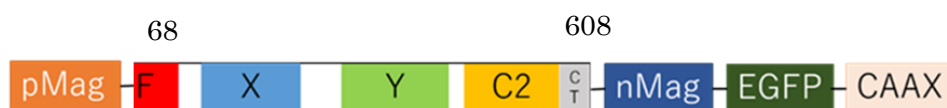
pMag-hPLC ζ -nMag



pMag-hPLC ζ [35-608]-nMag



pMag-hPLC ζ [68-608]-nMag



pMag-hPLC ζ [103-608]-nMag



pMag-hPLC ζ [103-608]-nMag



図 2.1 pMagFast2, nMagHigh1 結合型 PLC ζ の構造

本研究で作製した pMagFast2, nMagHigh1 結合型 PLC ζ の構造。数字は N 末側のメチオニンから数えたアミノ酸残基数を示している。

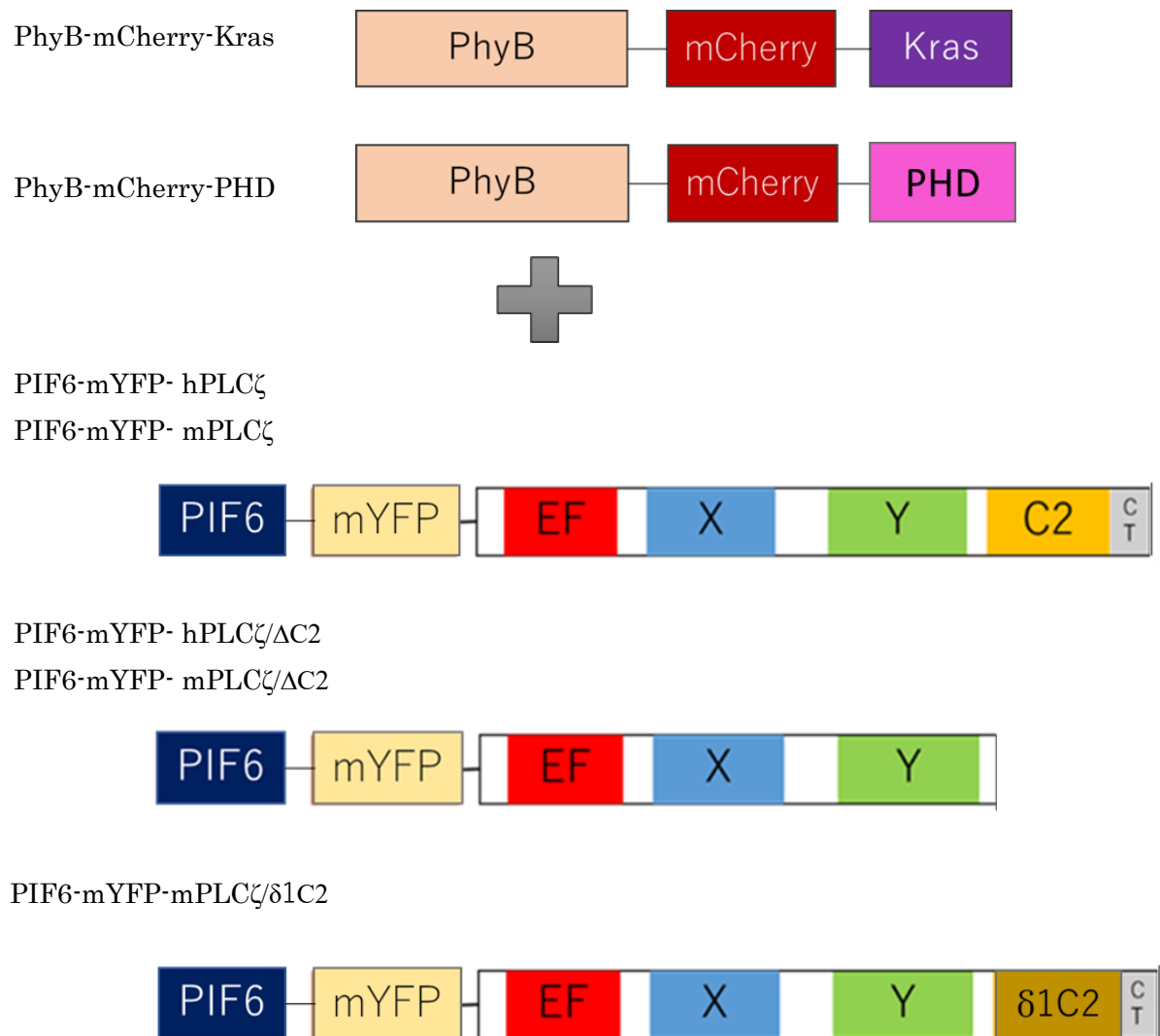


図 2.2 膜移行配列結合型 PhyB, PIF6 結合型 PLC ζ の構造

本研究で作製した膜移行配列 Kras 及び PHD 結合型 PhyB と、PIF6 結合型 PLC ζ の構造。

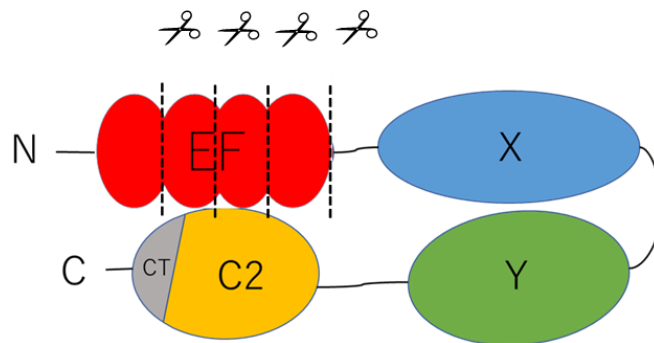
2.1 膜移行配列

本研究では Magnet 結合型 PLC ζ と PhyB に膜移行配列を付加した。PLC ζ による IP $_3$ 産生は、細胞膜を構成する PIP $_2$ を加水分解することで行われる。そのため Magnet 結合型 PLC ζ や、PIF6-PLC ζ と結合する PhyB が膜移行することで、PIP $_2$ との結合および IP $_3$ 産生が効率的になると考えたためである。そこで今回はがん原遺伝子である KRas の C 末端配列 (Kras/CT) と PLC δ 1 の PHD を用いた。KRas の C 末端はファルネシル化の標的配列 (CAAX モチーフ) を持ち、翻訳後に C 末端から 4 番目のシステインにイソプレニル基が付加される。C 末端のシステイン残基が修飾されたことで膜に対する親和性が付与され、細胞膜に結合する。PHD は PLC ζ の相同体である PLC δ 1 の N 末端にあるドメインであり、細胞膜直下の小胞のリン脂質に特異的かつ高親和に結合する^[23]。

2.2 光受容体を用いた欠損型 PLC ζ の活性化機構

光感容タンパク質を用いて、PLC ζ の酵素活性を光制御する試みとして欠損型 PLC ζ を作成した。欠損型 PLC ζ の場合どれほど活性が落ちるのか、また全長 PLC ζ を欠損型 PLC ζ に置き換えた場合、光制御によって落ちた活性がどれほど再起するのかを調べた。Magnet を用いた実験では、ヒト PLC ζ の活性化型になるために必要な、C2 ドメインと結合すると考えられている EF ハンドドメインをドメインごとに 4 か所で切断し、活性の変化を観察した (図 2.3)^[24]。PhyB/PIF6 を用いた実験では、細胞膜へと移行する機能を持つと考えられている C2 ドメインをヒト PLC ζ とマウス PLC ζ それぞれで切断したものと、マウス PLC ζ の C2 ドメインをリン脂質への結合力の弱いと考えられている、ラット PLC δ 1 の C2 ドメインに置換して、活性の変化を観察した (図 2.4)^[24]。

A



B

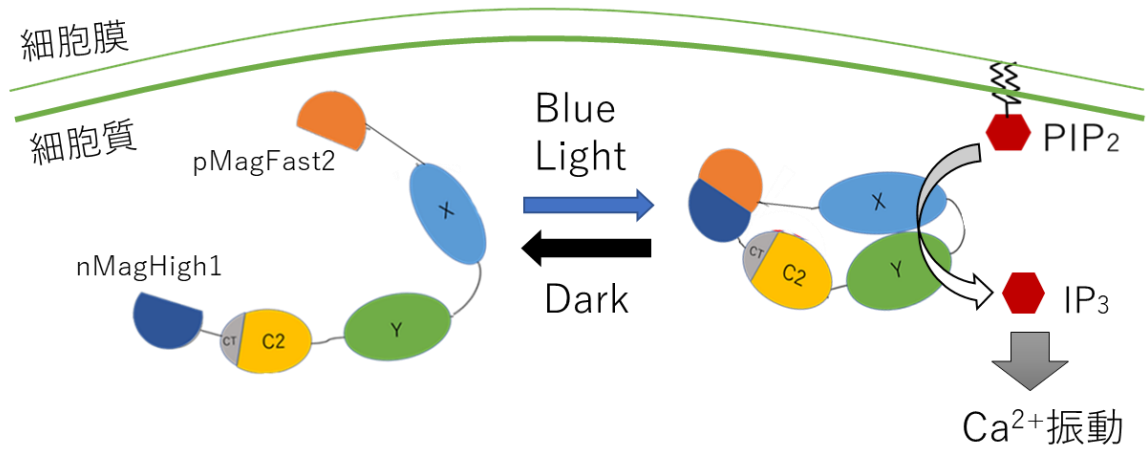


図 2.3 EF ドメイン欠損型 PLC ζ と活性化機構

(A) PLC ζ の切断箇所 4 パターン。(B) EF ドメインをすべて切断した場合の活性化機構。青色光が照射されることで pMagFast2 と nMagHigh1 が結合し、PLC ζ のフォールディングが助長されることで PIP $_2$ の加水分解が促進される。

The diagram illustrates a protein structure with four domains: EF (red), X (blue), C2 (yellow), and Y (green). The N-terminus is on the left, followed by the EF domain, then domain X, and finally domain Y. A dashed line and scissors indicate a cleavage site between domain X and domain Y. The C-terminus is on the left, followed by the C2 domain, and finally domain Y.

細胞膜

細胞質

Kras

mCherry

PIF6

mYFP

EF

赤色光

遠赤色光

PIP₂

IP₃

Ca²⁺振動

(A) PLC ζ の切断箇所。(B) C2ドメインを切断した場合の活性化機構。膜移行配列をつなげたPhyBを膜に局在させ、赤色光が照射されることでPhyBとPIF6が結合し、PLC ζ が膜近くへ移行されることでPIP $_2$ の加水分解が促進される。

2.3 pMag-hPLC ζ [35,68,103,147-608]-nMag-EGFP-CAAX の作製

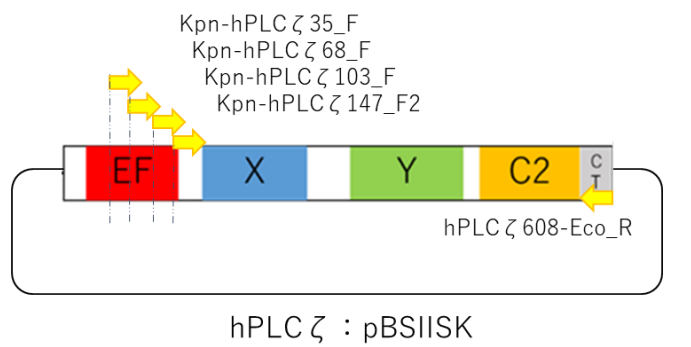
4 種類の欠損型 PLC ζ を挿入した pMag-hPLC ζ [35,68,103,147-608]-nMag-EGFP-CAAX の作製ではまず、本研究室で所有する hPLC ζ : pBSIISK から hPLC ζ [35-608]、hPLC ζ [68-608]、hPLC ζ [103-608]、hPLC ζ [147-608] を PCR により増幅させた。そして本研究室で所有する pMag-PLC ζ -nMag-EGFP-CAAX : pGLS (A21) 8T をテンプレートとして、pMag-PLC ζ 、PLC ζ -nMag の間を制限酵素で切断し、4 種類の欠損型 hPLC ζ を間に挿入した。pMag-hPLC ζ [35,68,103,147-608]-nMag-EGFP-CAAX 作成の概略図が図 2.5 である。

2.3.1 翻訳領域の増幅

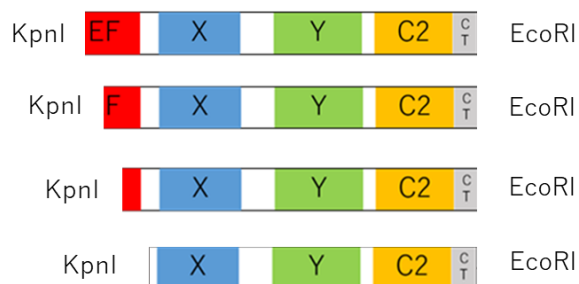
付録の表 1 の組成で溶液を調整し、表 2 の PCR 条件に従って PCR を行い、目的翻訳領域を増幅した。なお、PCR は Prime STAR[®] HS DNA Polymerase (TAKARA) を使用し、添付されている説明書に従った。増幅終了後、PCR 産物に 10×Loading Buffer 2.0 μ L を加え、1%アガロースゲルを用いて 30 分間電気泳動した。その後 Mono Fas[®]DNA 精製キット (GL Science) のプロトコルに従いゲルから DNA 精製を行った。

2.3.2 制限酵素処理

制限酵素を用いて精製した DNA とベクターの DNA を制限酵素処理した。表 3 の組成で溶液を作製し、CO₂ インキュベーターに一晩置いてライゲーション反応させた。その後、適当な条件で電気泳動を行い、Mono Fas[®]DNA 精製キット (GL Science) のプロトコルに従いゲルから DNA 精製を行った。



翻訳領域の増幅



KpnIとEcoRIで切断して挿入

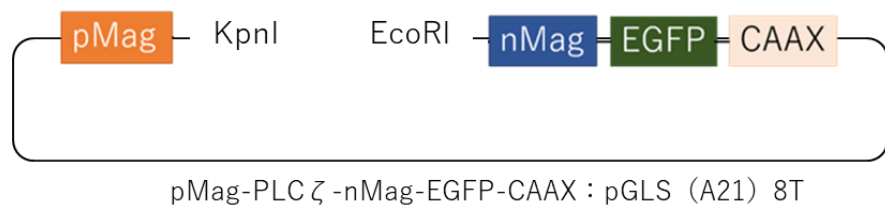


図 2.5 pMag-hPLC ζ [35,68,103,147-608]-nMag-EGFP-CAAX の作製概要

KpnI と EcoRI で切断して pMag-PLC ζ -nMag-EGFP-CAAX : pGLS (A21) 8T の PLC ζ を切断した部分に欠損型 PLC ζ を挿入した。

2.3.3 プラスミドベクターへサブクローニング

精製したインサート DNA をプラスミドベクターDNA に連結させ、大腸菌に形質転換した。まずインサート DNA 4.0 μ L, ベクターDNA 1.0 μ L, Ligation Mix (by TaKaRa) 5.0 μ L をよくピペッティングして混ぜ、16°Cインキュベーターで 30 分間ライゲーションを行った。そして Competent Cell (XL-1 Blue) 100 μ L に加え、ヒートショックを行った後、LB+Ampicillin+Tetracycline プレートに撒いて伸ばし、37°Cインキュベーターでオーバーナイト処理した。コロニーの培養を確認した後、コロニーをピックアップし、500 μ L LB+Ampicillin 培地に入れ、37°Cインキュベーターで 5 時間振とう培養した。

2.3.4 コロニーPCR による確認

インサート DNA とプラスミドベクターDNA の連結と大腸菌への形質転換を確認するために、表 5 の組成に従ってコロニーPCR を行った。コントロールなどで培養液の代わりに既存の cDNA を加える場合は 1.0 ng 加えた。増幅後、PCR 産物に 10 \times Loading Buffer 2.0 μ L を加え、2%アガロースゲルを用いて 30 分間電気泳動した。

2.3.5 プラスミド DNA の精製

培養した大腸菌を 37°Cオーバーナイト回転培養で大量培養した後、Wizard Plus Minipreps (promega) を用いてプラスミドを精製した。まず培養液を遠心分離し、沈殿物に Cell Resuspension Solution、Cell Lysis Solution、Neutralization Solution を 3 mL ずつ加えて、混和させた。遠心分離し、上澄み溶液に Midi Preps を 10 mL 加えた。Midi column を真空管に装着し、溶液を流した後、Colum wash solution 15 mL を加え全てを流した。遠心をかけた後、カラムを新しいチューブに取り付け、70 °Cの Milli-Q を 300 μ L

加えた。1 分後、遠心分離し新しいチューブに取り付けた。そして溶液の 1/10 量の Sodium Acetate と溶液の 3 倍の量の 99.5%エタノールを加えた。よく混ぜた後、-80℃で 30 分以上保存した。保存後、遠心分離して沈殿を崩さないように上澄みだけをピペットで取り除いた。インキュベーターで溶液を乾かした後、60℃の 1/10TE を 21 μ L 加え溶かした。精製したプラスミド DNA の濃度を dsDNA 値の吸光度計で測定した。最後に 1/10TE で濃度を 1.0 μ g/ μ L に調整した。

2.4 変異体 PIF6-mYFP-mPLC ζ , PIF6-mYFP-hPLC ζ , PIF6-mYFP-mPLC ζ / Δ C2, PIF6-mYFP-hPLC ζ / Δ C2 の作製

PIF6-mYFP-mPLC ζ と PIF6-mYFP- mPLC ζ / Δ C2 は、研究室で所蔵している mPLC ζ : pBSIISK+から mPLC ζ の全長と C2 ドメインを欠いた mPLC ζ / Δ C2 を PCR により増幅させ、PIF6APB-mYFP-5aaLinker : pGLS (A21) 8T の 5aaLinker の後ろに挿入した。同様に hPLC ζ : pBSIISK から mPLC ζ と mPLC ζ / Δ C2 を PCR により増幅させ、PIF6APB-mYFP-5aaLinker : pGLS (A21) 8T に挿入した (図 2.6)。

2.4.1 翻訳領域の増幅から DNA 精製

PCR による目的翻訳領域の増幅から DNA 精製に至るまでの実験手順は 2.3.1~2.3.5 と同様である。

2.5 変異体 PhyB-mCherry-PHD, PIF6-mYFP-mPLC ζ / δ 1C2 の作製

これまで DNA の挿入は制限酵素処理とライゲーション反応により行ってきたが、PhyB-mCherry-PHD と PIF6-mYFP-mPLC ζ / δ 1C2 は PCR とインキュベーションによるインフ

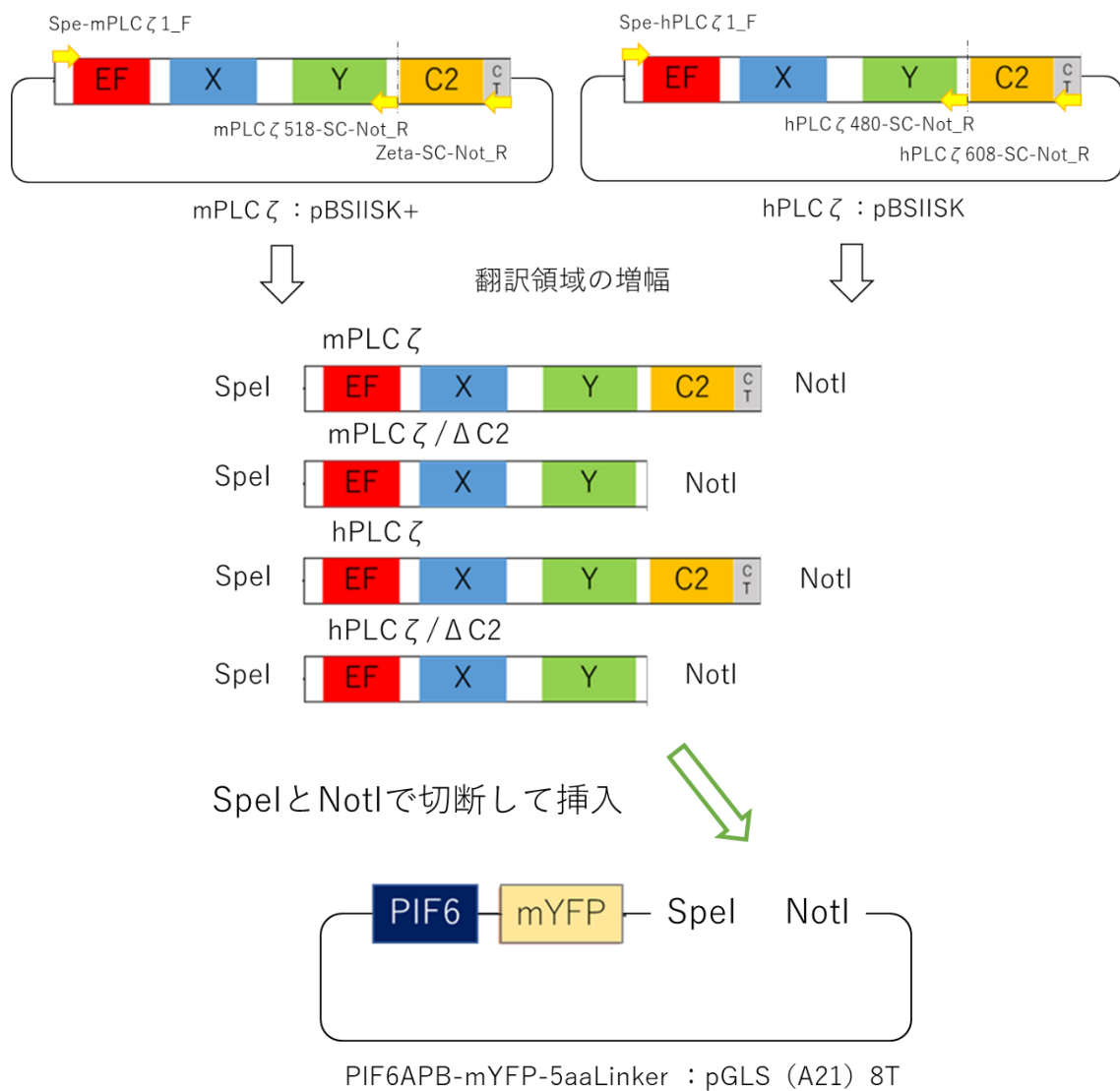


図 2.6 の作製概要

SpeI と NotI で切断して PIF6APB-mYFP-5aaLinker : pGLS (A21) 8T に mPLC ζ と mPLC ζ / Δ C2、hPLC ζ と hPLC ζ / Δ C2 を挿入した。

ユージョン反応によって DNA 挿入を行った。PhyB-mCherry-PHD は PhyB-mCherry-Kras:pGLS(A21)8T から Kras を除いたベクター領域を増幅し、研究室で所蔵している mPLC δ 1:pBSIISK+から PHD 領域を増幅してベクターに DNA に挿入した。PIF6-mYFP-mPLC ζ / δ 1C2 は PIF6-mYFP-mPLC ζ :pGLS(A21)8T から C2 ドメインを除いたベクター領域を増幅し、mPLC δ 1:pBSIISK+から C2 ドメイン領域を増幅してベクターに DNA に挿入した (図 2.7)。

2.5.1 翻訳領域の増幅 (インフュージョン)

付録の表 6 の組成で溶液を調整し、表 7 の PCR 条件に従って PCR を行い、目的翻訳領域を増幅した。なお、PCR は Prime STAR[®] Max DNA Polymerase (TAKARA) を使用し、インサートではベクター上の挿入したい位置の両側 15 塩基とそれぞれ相補的な配列を付加したプライマーで増幅し、添付されている説明書に従った。

2.5.2 インフュージョン

PCR を行ったインサートとベクターの溶液を合わせ、50°C インキュベーターに 15 分置いてインフュージョン反応させた。

2.5.3 プラスミドベクターへサブクローニングから DNA 精製

プラスミドベクターへサブクローニングから DNA 精製の手順は 2.3.3~2.3.5 と同様である。

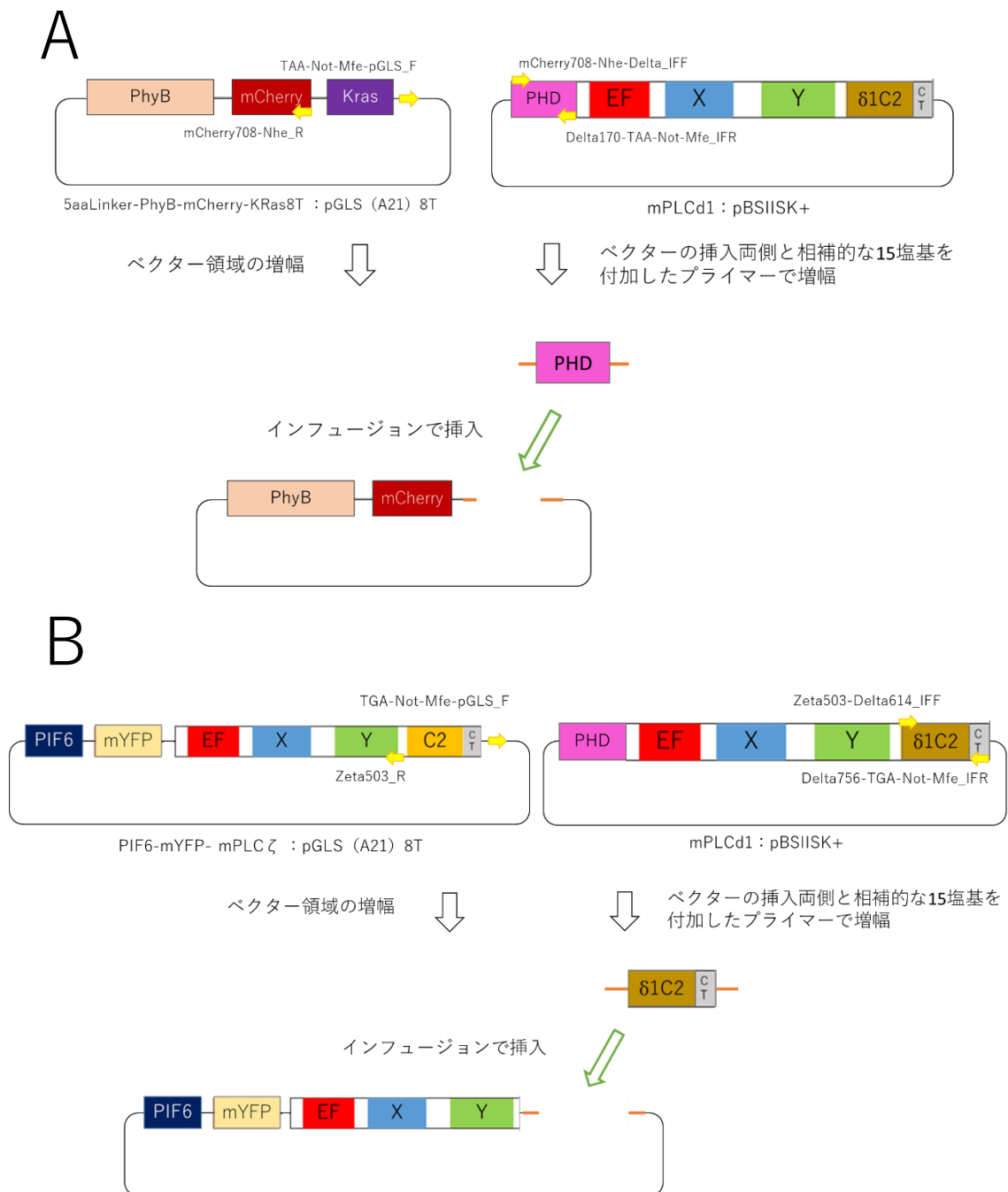


図 2.7 PhyB-mCherry-PHD, PIF6-mYFP-mPLC ζ /δ1C2 の作製概要

(A) PCR により PhyB-mCherry-Kras からベクター領域を、mPLCδ1 から PHD を増幅してインフュージョンにより挿入。(B) PCR により PIF6-mYFP-mPLC ζ からベクター領域を、mPLCδ1 から C2 ドメインを増幅してインフュージョンにより挿入。

2.6 RNA の合成

マウスの卵細胞で作製した変異体 DNA を発現させるには RNA 導入する必要があるため、精製した DNA から RNA を合成した。RNA 合成には、mMESSAGE mMACHINE® Kit(Ambion) を使用し、添付されている説明書に従った。まず表 8 の制限酵素処理の組成で溶液を調整し 37°C インキュベーターでオーバーナイト処理した。次に Proteinase K (1 mg/mL) を 10 μ L 加え、50°C で 30 分間インキュベートした。カラムに移し、Buffer ERC を 300 μ L 加えて遠心、Buffer PE 750 μ L を加えて遠心をした。DNA を溶出するため、RNase-free water 10 μ L を加え、遠心して精製した。次に新しいチューブに、表 9 の溶液を入れて、穏やかに混ぜ 37°C で 2 時間インキュベートした。その後 TURBO DNase 1.0 μ L を加え、37 °C で 30 分間インキュベートした。精製のため 80 μ L の RNase-free water、Buffer RLT 350 μ L、100% EtOH 250 μ L を加え、カラムに移し遠心した。そして Buffer RPE 500 μ L を加えて遠心、80% EtOH 500 μ L を加えて遠心した。新しいチューブにカラムを移し変え、15 μ L の RNase-free water を中心の薄膜を濡らすように加えて遠心で精製した。RNase inhibitor を 1 μ L と 150 mM KCl 溶液を用いて各 RNA サンプルを 1 μ g/ μ L に調整し、-80°C で保存した。

2.7 変異体 RNA のマウス卵細胞での Ca²⁺オシレーション誘発活性の観察

作製した RNA を成熟したマウスの卵細胞に注入して、マウス卵細胞で発現させ、Ca²⁺オシレーションを誘発するか観察した。

2.7.1 ddY メスマウスの成熟卵の採取

まず ddY メスマウスに妊馬血清性性腺刺激ホルモン (PMSG) を皮下注射した。PMSG

を投与してから 48 時間後、ヒト絨毛性ゴナドトロピン (hCG) を腹腔内注射した。hCG を投与してから 16 時間後、頸椎脱臼して心肺停止後、腹部を解剖して卵管を摘出した。そして双眼実体顕微鏡で観察しながら、注射針を用いて卵管膨大部の一部を破り、中身を 200 μ L の M2 に 50 μ L のヒアルロニダーゼ (0.05%) が加えられた溶液のドロップへ移した。それを約 5 分間室温で置き、卵丘細胞を除去した。さらにプラスチックディッシュ内に M2+BSA ドロップを 3 つ作り、マニピュレーションピペットを用いて卵細胞を順にドロップに移し、洗浄した。

2.7.2 マイクロインジェクション

洗浄した卵細胞を 400 μ L の M2+BSA ドロップで満たし流動パラフィンで覆ったガラスボトムディッシュに移し、蛍光顕微鏡に取り付けてあるリングヒーターに固定した。次にマイクロピペッターを用いて、RNA サンプルをインジェクション用マイクロピペットにロードした。RNA サンプルが光応答性を持つため、部屋の電気を消し、補色光のみを付けた。そして蛍光顕微鏡で観察しながら、ホールディングピペットで卵を固定し、インジェクション用マイクロピペットで卵に RNA サンプルを注入した。

2.7.3 前培養

卵細胞内に RNA サンプルを発現させるため、マイクロインジェクションの後、最大 5 時間ガラスボトムディッシュごと CO₂ インキュベーターに入れて前培養した。Ca²⁺オシレーションの測定のため、卵細胞を M2+BSA で希釈した Fura-2 AM 2 μ M のドロップに移し、10 分間 CO₂ インキュベーターでロードした。また、卵細胞を M2+BSA で希釈した補因子のドロップに移し、CO₂ インキュベーターでロードした。

2.7.4 蛍光顕微鏡による観察

卵細胞の観察は従来型倒立蛍光顕微鏡を使用した。励起光源は Xe ランプを用いた。フィルター切り替え機により外部制御で Xe ランプからの光を選択し、選択された励起光はダイクロイックミラーに反射され卵細胞内の蛍光物質に照射される。蛍光物質が発した蛍光はダイクロイックミラーと蛍光フィルターを通過し、SIT カメラに到達する (図 2.8)。フィルターやシャッターの制御、画像の取り込み、解析には Optical Image: NIH image 1.62 b30 (NIH, USA) と Image J: Image J 1.41 (NIH, USA) を用いた。Optical Image の測定条件 2.7.5 の通りである。

2.7.5 蛍光測定

a. fura-2 の測定

fura-2 の励起波長は 340 nm と 380 nm、蛍光波長は 510 nm である。実際の励起波長は 340 nm と 380 nm だが、蛍光強度変化の大きい励起波長は 340 nm と 380nm である。fura-2 は Ca^{2+} の濃度によって蛍光強度が変化する蛍光色素である。340 nm 励起で得られる 510 nm (青緑色) の蛍光は Ca^{2+} の上昇によって増大する。一方、380 nm 励起で得られる同波長の蛍光は Ca^{2+} の上昇によって減少する^[25]。これらの蛍光強度の比を取ることで Ca^{2+} 濃度の変化を観察することができる。340 nm あるいは 380 nm の励起フィルターとダイクロイックミラー505DRIP/蛍光フィルター535AF264 により ND50%で Fura-2 を測定した。

fura-2 の測定は前培養が終わった後、蛍光顕微鏡のリングヒーターにガラスボトムディッシュを固定させた。pMaFast2, nMagHigh1 の実験では、青色光照射時の Ca^{2+} 濃度変化の挙動を見るため、暗室中で Xe ランプより 490 nm の青色光を照射し、画像取得のときのみ 340 nm と 380 nm の励起光に切り替えて fura-2 を測定した。30 秒ごとに暗室時で 1 時間、青色光照射時で 1 時間、可逆性を観察するため更に暗室時で 1 時間の計 3 時間行った。

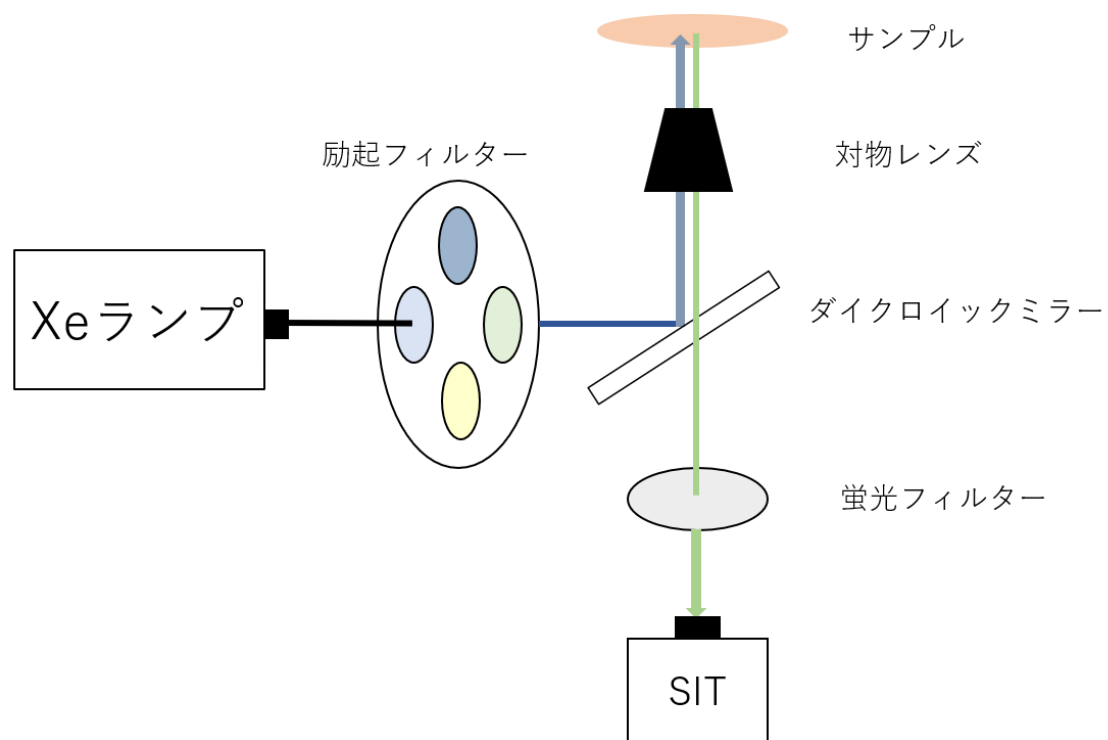


図 2.8 顕微鏡模式図

回転式励起フィルターを用いて Xe ランプから 340 nm および 380 nm の光を選択し、選択された励起光はダイクロイックミラーで反射されて対物レンズを通り、サンプルに照射されて Ca^{2+} 濃度依存性の蛍光が放出される。蛍光はダイクロイックミラーと蛍光フィルターを通り、SIT カメラに取得される。

PhyB/PIF6 の実験では、暗室中で顕微鏡からの照射光をフィルターによって赤色光（650 nm）と、遠赤色光（750 nm）に切り替えて fura-2 を測定した。30 秒ごとに遠赤色光照射時で 1 時間、赤色光照射時で 1 時間、また遠赤色光照射時で 1 時間の計 3 時間行った。

b. EGFP の測定

EGFP の励起波長は 515 nm、蛍光波長は 528 nm である。卵細胞に注入した RNA の発現量を測定するため、RNA の EGFP を測定した。490 nm の励起フィルムとダイクロイックミラー505DRIP/蛍光フィルター535AF26 により ND50%で EGFP を測定した。測定は 3 時間の fura-2 測定を行う前後に行った。

c. mYFP の測定

mYFP の励起波長は 514 nm、蛍光波長は 527 nm である。卵細胞に注入した RNA の発現量を測定するため、RNA の mYFP を測定した。490 nm の励起フィルムとダイクロイックミラー505DRIP/蛍光フィルター645AF75 により ND50%で mYFP を測定した。測定は 3 時間の fura-2 測定を行う前後に行った。

d. mCherry の測定

mCherry の励起波長は 587 nm、蛍光波長は 610 nm である。卵細胞に注入した RNA の発現量を測定するため、RNA の mCherry を測定した。560 nm の励起フィルムとダイクロイックミラー570DRIP/蛍光フィルター645AF75 により ND25%で mCherry を測定した。測定は 3 時間の fura-2 測定を行う前後に行った。

2.7.6 解析

a. fura-2 の解析

Optical Image を用いて、卵細胞質内の fura-2 の 340 nm 励起での蛍光強度から卵細胞の存在しない部分の光の強度を引いたものを 380 nm 励起での蛍光強度から卵細胞の存在しない部分の光の強度を引いたもので割り、その比を Fura-2 の蛍光強度とした。

b. EGFP の解析

Optical Image を用いて、卵細胞質内の EGFP の 515 nm 励起での蛍光強度から卵細胞の存在しない背景の光の強度を引いたものを EGFP の蛍光強度とした。

c. mYFP

Optical Image を用いて、卵細胞質内の mYFP の 514 nm 励起での蛍光強度から卵細胞の存在しない背景の光の強度を引いたものを mYFP の蛍光強度とした。

第 3 章 実験結果

3.1 pMagFast2, nMagHigh1 結合型 PLC ζ の光活性評価

pMagFast2, nMagHigh1 結合型 PLC ζ を発現させたマウス成熟卵における、細胞内 fura-2 蛍光強度比の変化の典型例を図 3.1 に示した。この fura-2 蛍光測定は、暗室 1 時間、青色光照射 1 時間、暗室 1 時間の条件で行った。pMag-PLC ζ -nMag のとき、5 ng/ μ L と低濃度で Ca²⁺オシレーションを引き起こすことができた。しかし、Ca²⁺オシレーションは青色光照射の前に始まり、その後青色光照射時と 2 回目の暗室時において続き、光応答性は見られなかった。pMag-PLC ζ [35-608]-nMag (150 ng/ μ L) と pMag-PLC ζ [68-608]-nMag (100 ng/ μ L) のときは、EF ハンドドメインを欠損させてもなお全長 PLC ζ の場合と同様に Ca²⁺オシレーションを引き起こすことができた。しかし、Ca²⁺オシレーションは青色光照射の前に始まり、その後光照射に関係なく引き続き、光応答性は見られなかった。そして EF ハンドドメインの欠損部位が長い pMag-PLC ζ [103-608]-nMag と pMag-PLC ζ [147-608]-nMag のとき、300 ng/ μ L という高濃度においても Ca²⁺オシレーションは起きず、光応答性を見ることはできなかった。実験を行った 5 サンプルの卵について、Ca²⁺オシレーション発生例数と青色光照射時に Ca²⁺スパイクが発生した例数、光応答性があったかどうかの確認のため暗室時よりも Ca²⁺スパイク数が多かった例数を表 3.1 にまとめた。Ca²⁺オシレーションが測定の途中から始まる場合や、測定の途中で終わってしまうこともあるため、青色光照射時と暗室時の比較として、暗室時 1 回目と 2 回目の Ca²⁺スパイク数の平均と比較した場合と、1 回目かつ 2 回目両方に対して Ca²⁺スパイク数が多かった例数をまとめたが、青色光照射時のみ Ca²⁺スパイク数が増えるような明らかな差はなく、光応答性を確認できなかった。

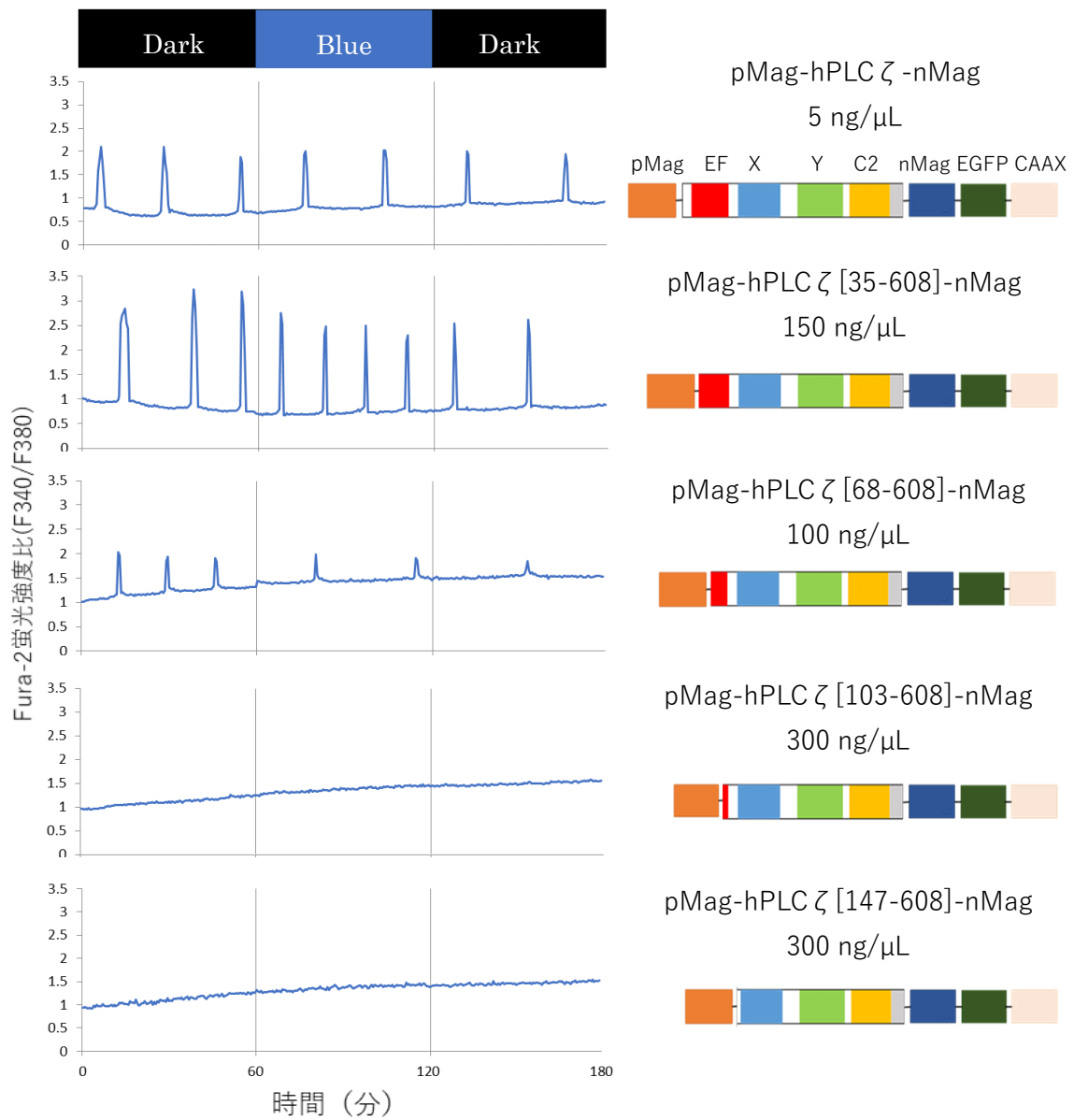


図 3.1 pMag-hPLC ζ [1,35,68,103,147-608]-nMag の典型的な Ca^{2+} オシレーション例

グラフは pMag-hPLC ζ [1,35,68,103,147-608]-nMag それぞれの fura-2 蛍光強度比の波形であり、 Ca^{2+} オシレーションの様子を示している。

表 3.1 Magnet における Ca^{2+} スパイク発生例数のまとめ

サンプル	総例数	スパイク 発生例数	青色光での スパイク発生例数	スパイク数が 青色 > 暗室(平均) の例数	スパイク数が 青色 > 暗室(両方) の例数
pMag-hPLC ζ [1-608]-nMag	40	39	36	28	12
pMag-hPLC ζ [35-608]-nMag	87	32	22	15	3
pMag-hPLC ζ [68-608]-nMag	33	12	12	5	0
pMag-hPLC ζ [103-608]-nMag	25	0	0	0	0
pMag-hPLC ζ [147-608]-nMag	44	0	0	0	0

3.2 PhyB/PIF6 結合型の PLC ζ の光活性評価

3.2.1 PhyB/PIF6 の膜移行評価

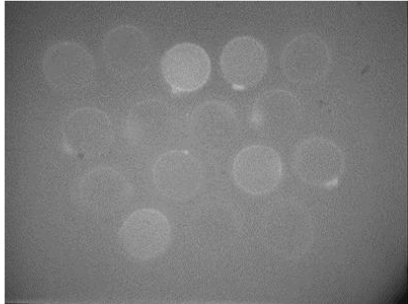
PhyB と PIF6 が光応答性によって結合することを確認するため、PhyB-mCherry-Kras と PLC ζ の付いていない PIF6-mYFP を用いて PIF6-mYFP の膜移行変化を観察した。まず PhyB-mCherry-Kras を細胞膜に局在させ、発現させた PIF6-mYFP が遠赤色光と赤色光照射時で細胞膜に移行するかを細胞質中の PIF6-mYFP の蛍光から確認した。PhyB-mCherry-Kras と PIF6-mYFP の測定前の蛍光画像と、卵細胞質中の mYFP 蛍光強度変化のグラフを図 3.2 に示した。測定中 4 時間は PIF6-mYFP の RNA 翻訳によって細胞質中の蛍光強度は上がり続けているが、赤色光を照射した 1 回目の 1 時間と 2 回目の 1 時間中は細胞質中の蛍光強度が減少し、PIF6-mYFP が細胞膜へと移行したことを確認した。

3.2.2 PhyB-mCherry-Kras, PhyB-mCherry-PHD, PIF6 結合型 PLC ζ の光活性評価

まず PhyB-mCherry-Kras を用いて、PIF6 結合型 PLC ζ を発現させたマウス成熟卵における、細胞内 fura-2 蛍光強度比の変化の典型例を図 3.3 に示した。この fura-2 蛍光測定は、遠赤色光 1 時間、赤色光照射 1 時間、遠赤色光 1 時間の条件で行った。PIF6-mYFP-hPLC ζ と PIF6-mYFP-mPLC ζ のとき、それぞれ 1 ng/ μ L, 10 ng/ μ L と低濃度で Ca²⁺オシレーションを引き起こすことができた。しかし、Ca²⁺オシレーションは遠赤色光と赤色光照射時に関係なく起こり、光応答性は見られなかった。そして PIF6-mYFP-hPLC ζ /ΔC2 (100 ng/ μ L) でわずかな Ca²⁺オシレーションを見ることができたが光応答性は見られず、PIF6-mYFP-mPLC ζ /ΔC2 (300 ng/ μ L) と PIF6-mYFP-mPLC ζ /δ1C2 (300 ng/ μ L) については高濃度でも Ca²⁺オシレーションを見ることができなかった。

次に PhyB-mCherry-PHD を用いて、PIF6 結合型 PLC ζ を発現させたマウス成熟卵における、細胞内 fura-2 蛍光強度比の変化の典型例を図 3.4 に示した。PhyB-mCherry-PHD で

PhyB-mCherry-Krasの蛍光画像



PIF6-mYFPの蛍光画像

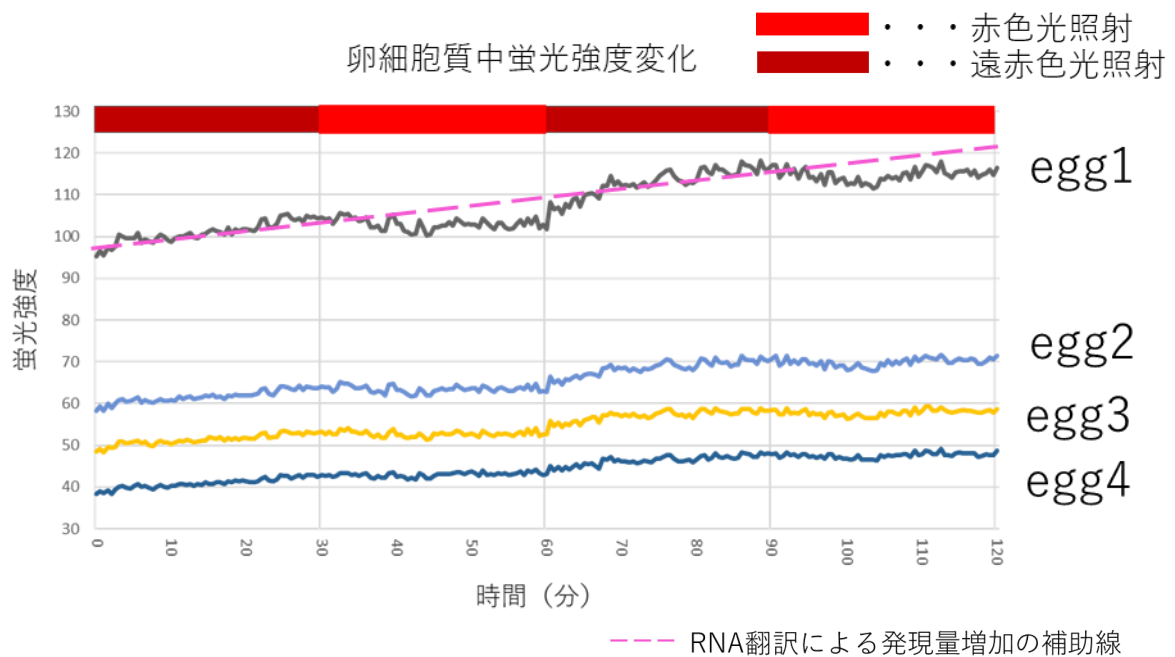
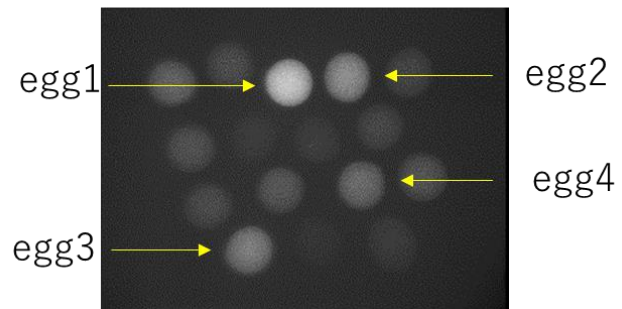


図 3.2 PhyB/PIF6 の膜移行変化

上側の画像が PhyB-mCherry-Kras と PIF6-mYFP の発現蛍光画像。グラフは卵細胞質中の PIF6-mYFP の蛍光強度変化である。赤色光照射時にのみ膜移行によって蛍光強度の増加が停滞している。

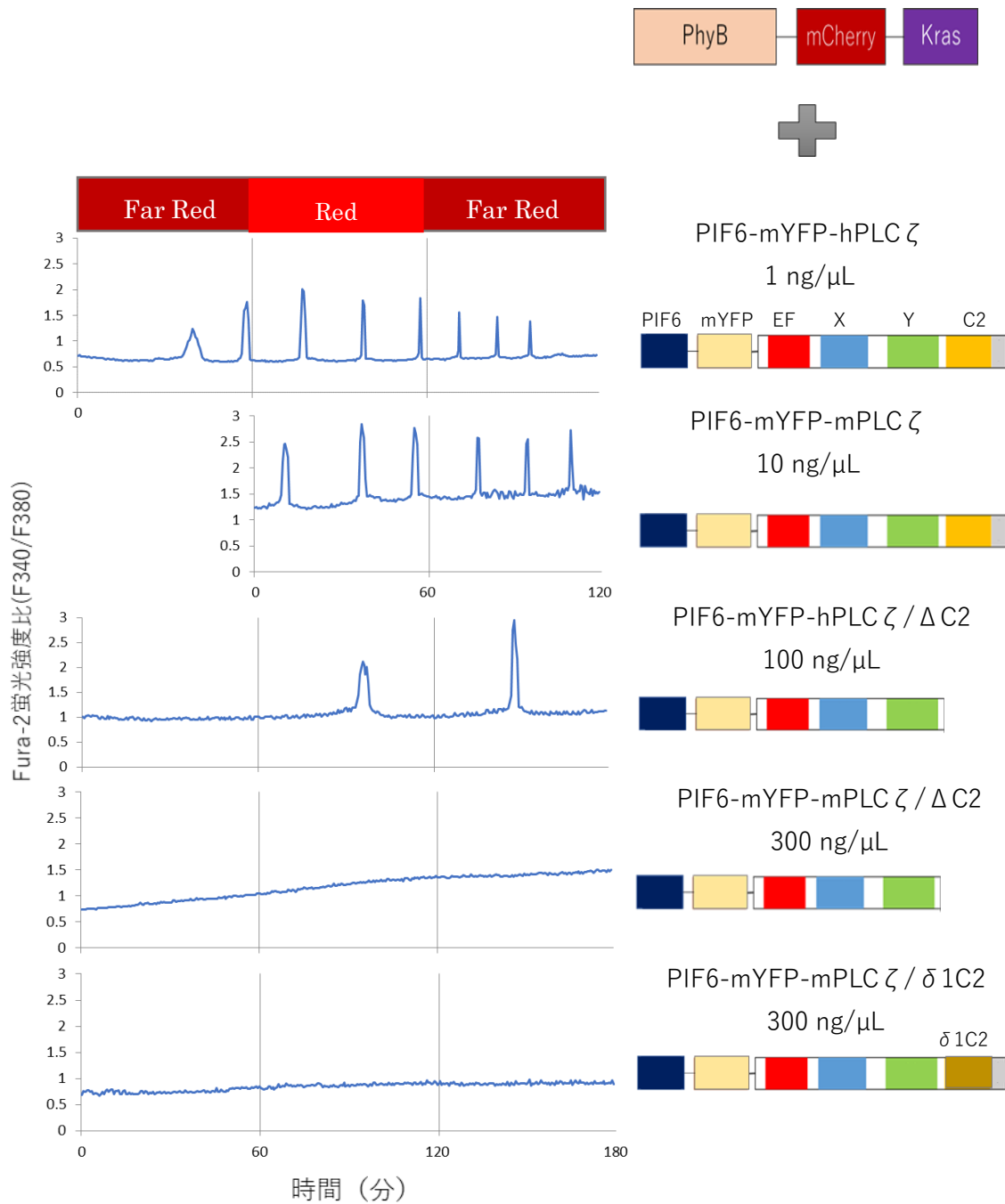


図 3.4 PhyB-mCherry-Kras と PIF6 結合型 PLCζ を用いた蛍光強度変化

グラフは PhyB-mCherry-Kras に加えて PIF6 結合型 PLCζ を発現させたときの fura-2 蛍光強度比の波形であり、Ca²⁺オシレーションの様子を示している。PIF6-mYFP-mPLCζ のときのみ遠赤色 1 時間、赤色 1 時間で測定した。

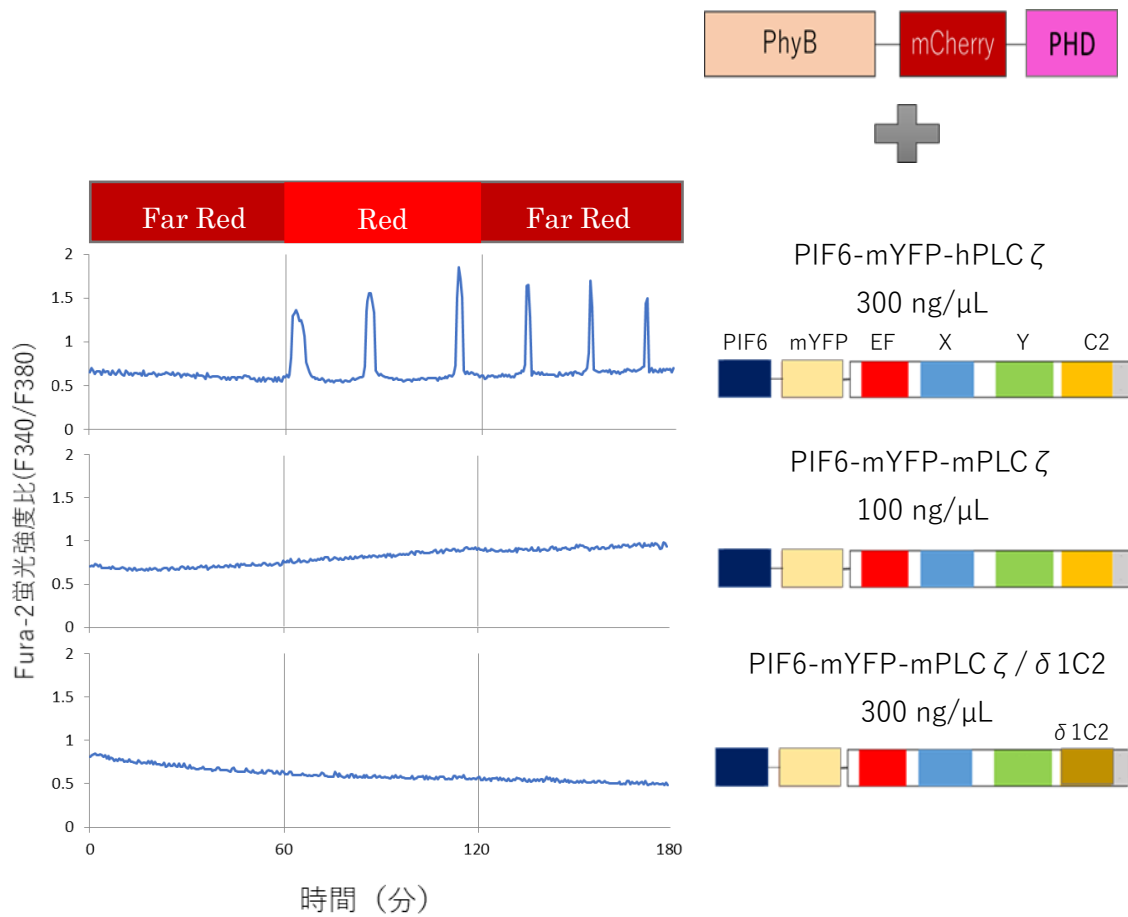


図 3.4 PhyB-mCherry-PHD と PIF6 結合型 PLC ζ を用いた蛍光強度変化

グラフは PhyB-mCherry-PHD に加えて PIF6 結合型 PLC ζ を発現させたときの fura-2 蛍光強度比の波形であり、 Ca^{2+} オシレーションの様子を示している。

は PIF6-mYFP-hPLC ζ 、PIF6-mYFP-mPLC ζ 、PIF6-mYFP-mPLC ζ / δ 1C2 の 3 サンプルで実験を行った。PIF6-mYFP-hPLC ζ (300 ng/ μ L) のとき、Ca²⁺オシレーションを見ることができたが、PIF6-mYFP-mPLC ζ (100 ng/ μ L) では同じ PLC ζ フルレングスであるにもかかわらず Ca²⁺オシレーションを見ることができなかった。意外なことに、PIF6-mYFP-mPLC ζ は PhyB-mCherry-Kras との組み合わせで Ca²⁺オシレーションを引き起こしたにも拘らず、PhyB-mCherry-PHD のとき Ca²⁺オシレーションを引き起こすことが出来なかった。そして PIF6-mYFP-mPLC ζ / δ 1C2 でも Ca²⁺オシレーションは見られなかった。光応答性確認のため、赤色光照射時の Ca²⁺スパイク数について表 3.2 にまとめた。しかし、赤色光照射時のみ Ca²⁺スパイク数が増えるような明らかな差はなく、光応答性を確認できなかった。

表 3.2 PhyB/PIF6 における Ca^{2+} スパイク発生例数のまとめ

サンプル		総例数	スパイク 発生例数	赤色光での スパイク発生例数	スパイク数が 赤 > 遠赤(平均) の例数	スパイク数が 赤 > 遠赤(両方) の例数
PhyB-mCherry-Kars	PIF6-mYFP-hPLC ζ	11	11	11	8	4
	PIF6-mYFP-mPLC ζ	22	20	14	0	0
	PIF6-mYFP-hPLC ζ / Δ C2	17	4	3	3	1
	PIF6-mYFP-mPLC ζ / Δ C2	55	0	0	0	0
	PIF6-mYFP-mPLC ζ / δ 1C2	59	1	0	0	0
PhyB-mCherry-PHD	PIF6-mYFP-hPLC ζ	18	12	8	4	2
	PIF6-mYFP-mPLC ζ	54	0	0	0	0
	PIF6-mYFP-mPLC ζ / δ 1C2	62	0	0	0	0

第4章 考察と今後の展望

本研究では、光受容体 Magnet と PhyB/PIF6 を用いることで、光照射で PIP₂ の結合および IP₃ の産生と Ca²⁺濃度の上昇を試みた。

Magnet では、pMagFast2 と nMagHigh1 の結合により PLC ζ の X-Y リンカー部分の折りたたみ機構を助長することで PIP₂ 結合と Ca²⁺濃度の上昇を試みた。しかし、Ca²⁺オシレーションの起きた pMag-hPLC ζ -nMag と pMag-hPLC ζ [35-608]-nMag, pMag-hPLC ζ [68-608]-nMag のスパイクの頻度から、青色光照射による PLC ζ の活性の増大は見られず、ヒト PLC ζ の酵素活性のさらなる増大はできなかった。この結果から光応答性が見られなかったのは、pMagFast2 と nMagHigh1 の結合機能によるヒト PLC ζ の X-Y リンカー部分折りたたみ機構助長の効果がなかったか、hPLC ζ の両端に結合させたことが hPLC ζ の折りたたみ機構を阻害してしまった可能性が考えられる。pMagFast2 と nMagHigh1 をそして、pMag-hPLC ζ [103-608]-nMag, pMag-hPLC ζ [147-608]-nMag では Ca²⁺オシレーションが起きなかったことから、ヒト PLC ζ は EF ハンドドメインを 3 つ以上切断すると活性を失うことが明らかとなった。

PhyB/PIF6 では、細胞膜に局在させた PhyB と PIF6 の結合により PLC ζ を PIP₂ が存在する細胞膜に移行させることで効率的な PIP₂ 結合と Ca²⁺濃度の上昇を試みた。しかし PhyB-mCherry-Kras との組み合わせのとき、Ca²⁺オシレーションの起きた PIF6-mYFP-hPLC ζ , PIF6-mYFP-mPLC ζ , PIF6-mYFP-hPLC ζ /ΔC2 でスパイクの頻度に変化はなく、赤色光照射による効率的な PIP₂ 結合は起きなかったと考えられる。また mPLC ζ の C2 ドメインを切断した PIF6-mYFP-mPLC ζ /ΔC2 と、リン脂質への結合が弱いと考えられている PLC δ 1 の C2 ドメインに寄せ替えた PIF6-mYFP-mPLC ζ /δ1C2 では Ca²⁺オシレーションが起きなかったことから、mPLC ζ は C2 ドメインが失われることで、たとえ PLC δ 1 の C2 ドメインに寄せ替えても活性を失ってしまうことが明らかとなった。そして Kras を細

胞膜ではなく細胞膜直下小胞のリン脂質に結合する PHD に乗せ替えた PhyB-mCherry-PHD との組み合わせのとき、PIF6-mYFP-hPLC ζ で Ca²⁺オシレーションは起きたが、Kras を用いたときに比べて明らかに Ca²⁺オシレーションが誘発される濃度が高かったため、PhyB-mCherry-PHD を用いたことで hPLC ζ の活性が落ちたことがわかった。さらに全長 mPLC ζ の PIF6-mYFP-mPLC ζ では Ca²⁺オシレーションを引き起こすことが出来なかったことから、PHD のリン脂質結合が mPLC ζ の PIP₂ 結合を阻害してしまった可能性が考えられる。しかし、Kras, PHD どちらにしても光応答性が見られなかったのは、PhyB 自体が PLC ζ の活性を物理的に阻害してしまった可能性が考えられる。または、PLC ζ に PIF6 と mYFP を繋げたことも活性の物理的阻害になってしまった可能性が考えられる。

今後の展望としては、新たな光受容体を用いた PLC ζ 活性化機構の開発を目指す。最近開発された光受容体として、PhyB/PIF6 の近赤外線応答性代替物である細菌のフィトクロム (BphP1) とそのパートナーである PpsR2^[26]や、青色光受容体シロイヌナズナのクリプトクロム 2 (CRY2) とそのパートナー BIC1 の短縮バージョンとして開発された Cry2PHR / CIBN^[27]がある。これらはどちらも必要とする補因子が内因性のため、外因性の添加が必要ない。これら二量体化する光受容体を新たな用いることで光スイッチによる PLC ζ 活性化のシステム開発を目指す。

謝辞

本研究を行う上での専門的な知識から実験方法、そして論文の執筆にいたるまで丁寧にご指導いただきました白川英樹准教授に心から感謝いたします。また、有益な議論だけでなく、様々な場面で大変お世話になりました白川研究室の皆様に感謝いたします。最後にさまざまな場面で貴重な助言や励ましを下さった皆様にこの場を借りて厚くお礼申し上げます。

参考文献

- [1] Runft L L, Laffe L A, Mehlmann L M. (2002). Egg activation at fertilization: where it all begins. *Dev Biol*, 245, 237-254.
- [2] Shirakawa H, Kikuchi T, Ito M. (2016). Calcium Signaling in Mammalian Eggs at Fertilization. *J Med Chem*, 16, 1-13.
- [3] Van Haastert P J, Van Dijken P. (1997). Biochemistry and genetics of inositol phosphate metabolism in *Dictyostelium*. *FEBS lett*, 410(1), 39-43.
- [4] Saunders C, Larman M, Parrington J, Cox L, Royse J, Blayney L, Swann K, Lai F. (2002). PLC zeta : a sperm-specific trigger of Ca^{2+} oscillations in eggs and embryo development. *Development*, 129, 3533-3544.
- [5] Nomikos M, Kashir J, Swann K, Lai F. (2013). Sperm PLC ζ : From structure to Ca^{2+} oscillations, egg activation and therapeutic potential. *FEBS lett*, 587, 3609-3616.
- [6] Berridge M J, Irvine R F. (1984). Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature*, 312, 315-321.
- [7] 金保安則. (2007). 細胞が生きるしくみ II—細胞内シグナル伝達—. サイエンス社
- [8] Nomikos M, Elgmati K, Theodoridou A, Georgillis A, Gonzalez-Garcia J R, Nounesis G, Swann K, Lai F. (2011). Novel regulation of PLC ζ activity via its XY-linker. *Biochem J*, 438, 427-432.
- [9] 中村由和. (2007). ホスホリパーゼ C の活性化機構と生理機能. 生化学 第 89 巻第 2 号 p.189-198
- [10] Kuroda K, Ito M, Shikano T, Awazi T, Yoda A, Takeuchi H, Kinoshita K, Miyazaki S. (2006). The role of X/Y linker region and Ca^{2+} oscillation including activities of phospholipase C ζ a mammalian egg-activating factor. *Biochem J*, 281, 27794-27805.

- [11] 津田拓也. (2015). イノシトールリン酸による細胞内 Ca^{2+} 濃度の制御に関する研究, 電気通信大学先進理工学研究科修士論文.
- [12] Deisseroth K, Hegemann P. (2017). The form and function of channelrhodopsin. *Science*, 357(6356).
- [13] Lewis T L Jr, Mao T, Svoboda K, Arnold D B. (2009). Myosin-dependent targeting of transmembrane proteins to neuronal dendrites. *Nat Neurosci*, 12, 568–576.
- [14] Christie J M, Salomon M, Nozue K, Wada M, Briggs W R. (1999). LOV (light, oxygen, or voltage) domains of the blue-light photoreceptor phototropin (nph1): Binding sites for the chromophore flavin mononucleotide. *PNAS*, 96(15), 8779–8783.
- [15] Lerner A M, Yumerefendi H, Goudy O J, Strahl B D, Kuhlman B. (2018). Engineering Improved Photoswitches for the Control of Nucleocytoplasmic Distribution. *ACS Synth Biol*, 7(12), 2898–2907.
- [16] Heintzen C, Loros JJ, Dunlap JC. (2001). The PAS Protein VIVID Defines a Clock-Associated Feedback Loop that Represses Light Input, Modulates Gating, and Regulates Clock Resetting. *Cell*, 104, 453–464.
- [17] Kawano F, Suzuki H, Furuya A, Sato M. (2015). Engineered pairs of distinct photoswitches for optogenetic control of cellular proteins. *Nat Commun*, 6, 6256.
- [18] Yu G, Onodera H, Aono Y, Kawano F, Ueda Y, Furuya A, Suzuki H, Sato M. (2016). Optical manipulation of the alpha subunits of heterotrimeric G proteins using photoswitchable dimerization systems. *Scientific Reports*, 6, 35777.
- [19] Furuya A, Kawano F, Nakajima T, Ueda Y, Sato M. (2017). Assembly Domain-Based Optogenetic System for the Efficient Control of Cellular Signaling. *ACS Synth Biol*. 6, 1086–1095.

- [20] Rockwell N C, Su Y, Lagarias J. (2006). Phytochrome structure and signaling mechanisms. *Annu Rev Plant Biol*, 57, 837-858.
- [21] Burgie E S, Zhang J, Vierstra R D. (2016). Crystal Structure of Deinococcus Phytochrome in the Photoactivated State Reveals a Cascade of Structural Rearrangements during Photoconversion. *Structure*, 24, 448-457.
- [22] Adrian M, Nijenhuis W, Hoogstraaten R I, Willems J, Kapitein L C. (2017). A Phytochrome-Derived Photoswitch for Intracellular Transport. *ACS Synth Biol*, 6, 1248-1256.
- [23] Bunney T M, Katan M. (2010). PLC regulation: emerging pictures for molecular mechanisms. *Trends Biochem Sci*, 36(2), 88-96.
- [24] Theodoridou M, Nomikos M, Parthimos D, Gonzalez-Garcia J R, Elgmati K, Calver B L, Sideratou Z, Nounesis G, Swann K, Lai A. (2013). Chimeras of sperm PLC ζ reveal disparate protein domain functions in the generation of intracellular Ca²⁺ oscillations in mammalian eggs at fertilization. *Mol Hum Reprod*, 19(12), 852-64.
- [25] 「fura-2 Calcium Indicator」 <<http://www.lifetechnologies.com/jp/ja/home/life-science/drug-discovery/target-and-lead-identification-and-validation/g-protein-coupled-html/cell-based-second-messenger-assays/fura-2-calcium-indicator.html>>
- [26] Kaberniuk A A, Shemetov A A, and Verkhusha V V. (2016). An optogenetic system based on bacterial phytochrome controllable with near-infrared light. *Nat Methods*, 13(7), 591-597.
- [27] Kennedy M J, Hughes R M, Peteya L A, Schwartz J W, Ehlers M D, Tucker C L. (2010). Rapid blue light induction of protein interactions in living cells. *Nat Methods*, 7(12), 973-975.

付録

使用器具

- ・オートクレーブ : MLS-2420 (SANYO)
- ・乾熱滅菌機 : NDN-400 (EYELA)
- ・電子分析天秤 : AB54-S (METTLER TOLEDO)
- ・ブロック CO₂ インキュベーター : B1-516C (ASTEC)
- ・クリーンベンチ : PCV (HITACHI)
- ・pH メーター : p B-11 (Santorius)
- ・ブロックインキュベーター : Dry Thermo Unit DTU-1B (TAITEC)
- ・サーマルサイクラー : PC320 (ASTEC)
- ・電気泳動装置 : GelMate®2000 (TOYOBO)
- ・電気泳動像撮影用デジタルカメラ : SP-510UZ (OLYMPUS)
- ・UV (302 / 365 nm) トランスイルミネーター : TFML-20E (UVP)
- ・デジタル仕様ゲル撮影装置 : PX410 (BIO CRAFT)
- ・卓上遠心分離機 : チビタン (Millipore)
- ・微量高速冷却遠心機 : MRX-150 (TOMY)
- ・微量高速冷却遠心機 : MX-301 (TOMY)
- ・小型振盪 (培養) 機 : DOUBLE SHAKER NR-3 (TAITEC)
- ・恒温槽 (Hot & Cool Bath) : EHC (AS ONE)
- ・試験管ミキサー (ボルテックス) : TH-1, HM-1 (AS ONE)
- ・分光光度計 : Biophotometer (Eppendorf)
- ・吸引加圧ポンプ : USS 型 (NRK)
- ・ホットスターラー : CHS-350 (AS ONE)
- ・双眼実体顕微鏡 : SMZ-2B (Nikon)

- ・ 蛍光顕微鏡 : IX71 (OLYMPUS)
- ・ パズコントローラー : SS-1433 (日本光電)
- ・ 蛍光顕微鏡光源 TH4-100 (OLYMPUS)
- ・ Flaming Brown Micropipette Puller : P-87 (Sutter Instrument)
- ・ マクロファージ : MF-90 (NARISHIGE)
- ・ Micro Injector : IM300 (NARISHIGE)
- ・ マイクロマニピュレーター : MX-2 (NARISHIGE)
- ・ 共焦点レーザー顕微鏡 : Axioskop (ZWISS)
- ・ 共焦点スキャナーユニット : CSU (横河電気)
- ・ 20G 注射針 : NN-2038R (TERMO)
- ・ 27G 注射針 : NN-2719 (TERMO)
- ・ 滅菌フィルター : Syringe Filter 33 mm (IWAKI)
- ・ プラスチックディッシュ : 35 × 10 mm style (FALCON)
- ・ 角カバーガラス : 24 × 24 No.1 (MARSUNAMI)
- ・ ワックス : Utility Wax (CG)
- ・ ホットプレート : MODEL HM-11 (ヤマト化学)
- ・ インジェクションピペット : 50 LAMBDA (cu, mm) with Aspirator (Drummond Scientific Company)
- ・ 測定用ディッシュ : プラスチックディッシュに直径 12 mm の穴を開け、ワックスを使用してカバーガラスで穴を塞ぎ作製した。
- ・ マイクロインジェクション用ピペット : ガラス毛细管ピペットを Flaming Brown Micropipette Puller でひき作製した。
- ・ ホールディングピペット : ガラス毛细管ピペットを Flaming Brown Micropipette puller でひき、マクロファージで加工し作製した。

試薬

■生理食塩水 (0.9%NaCl)

NaCl (Wako)	0.9 g
Milli-Q	Total 100 mL

オートクレーブで滅菌後、冷蔵保存。

■100 mM Na Pyruvate

100 mM Na Pyruvate (Wako)	100 mg
Milli-Q	Total 100 mL

10 mL ずつに分柱して冷凍保存。

■100 mM HEPES

HEPES (Wako)	2.38 mg
Milli-Q	Total 100 mL

室温で保存。

■1.0 M NaOH

NaOH (Wako)	4.0 g
Milli-Q	Total 100 mL

室温で保存。

■A10 ×

NaCl	5.53 g
KCl (Wako)	358 mg
CaCl ₂ · H ₂ O (Wako)	250 mg
MgSO ₄ · 7H ₂ O (Wako)	296 mg
Milli-Q	Total 100 mL

室温で保存。

■B10 ×

KH ₂ PO ₄ (Wako)	163 mg
NaHCO ₃ (Wako)	428 mg
Milli-Q	Total 100 mL

■M2

A10 ×	10 mL
B10 ×	10 mL
HEPES	10 mL
60% Na lactate (Sigma)	0.37 mL
100 mM Na Pyruvate	0.5 mM
Glucose (Wako)	100 mg
1.0 M NaOH	pH 7.2 に調整
Milli-Q	Total 100 mL

フィルターで滅菌して 5 mL ずつ分柱後、冷蔵保存。

これに BSA 20mg を加えたものが、M2+。

■10 × TE (Tris / EDTA)

Tris (Trishydroxymethylaminomethane) (Wako)	100 mM
EDTA (Ethylenediaminetetraacetic Acid) (Wako)	10 mM

■1 × TE

10 × TE	10 mL
Milli-Q (Millipore)	90 mL

オートクレーブで滅菌後、室温で保存した。

■50 × TAE (Tris / Acetate / EDTA) バッファー

Tris (Trishydroxymethylaminomethane) (Wako)	242 g
---	-------

酢酸 (Acetate) (Wako)	57.1 mL
0.5 M EDTA (Millipore)	100 mL
滅菌 Milli-Q (Millipore)	Total 1.0 L

室温で保存

■1 × TAE バッファー

50 × TAE	0.1 L
蒸留水	4.9 L

よく攪拌させた後、室温で保存

■アガロースゲル

Agarose-S (Wako) 1 % or 2%	2.0 g or 4.0 g
1 × TAE バッファー	200 mL
10 mg/ml EtBr (Ethidium Bromide) (Invitrogen)	8.0 µL

電子レンジで沸騰するまで加熱して溶解させ、60℃程度に冷めたら EtBr を 8.0 µL 加え、型に入れる。固まったら TAE に浸して冷蔵保存。

■抗生物質

アンピシリン (Ampicilin, Amp) (Genlantis)	50 mg/チューブ
1.0 mL の滅菌 Milli-Q に溶解して使用し、冷凍保存。	
2.0 mL テトラサイクリン (Tetracycline, TC) (GTS)	5 mg/チューブ
1.0 mL の 100%エタノール (EtOH) に溶解して使用し、遮光、冷凍保存。	

■LB (Luria-Bertani) 培地

LB 培地パウダー (Q-Bio Gene)	25 g
Milli-Q (Millipore)	1.0 L

オートクレーブで滅菌後、冷蔵保存。

■LB (Luria-Bertani) 寒天プレート

INA-Agar (伊那食品工業株式会社 F)	3.75 g
LB 培地	250 mL
50 mg/mL Ampicilin	250 μ L
5 mg/mL Tetracycline	1.0 mL

9 cm 滅菌シャーレ 10 枚に分注し、固まったら遮光し、冷蔵保存

■ケミカルコンピテントセル作製溶液

TB (Transformation バッファー)	
PIPES (Wako)	1.5 g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	1.1 g
KCl (Wako)	9.3 g

400 mL の Milli-Q に溶かし、5 M KOH (Wako) で pH 6.7 に調整した

MnCl₂ · 4H₂O (Wako)

Milli-Q で Total 500 mL にし、フィルター滅菌後、冷蔵保存し 3 日以内に使用。

■cDNA 関連

- ・制限酵素 (TAKARA)
- ・バッファー (TAKARA)
- ・Loadin バッファー (TAKARA)
- ・DNA Lader (TAKARA)
- ・Ligation Mix (TAKARA)
- ・DNA 精製キット (Monofas)
- ・Chemical Competent Cell XL-1Blue (stratagene)
- ・CRA、CLA、NSA (Wizard)
- ・Midpreps DNA Purification Resin (Wizard)

- Colmn Wash 溶液 (Wizard)

- Sodium Acetate

■RNA 関連

- 制限酵素 (TaKaRa)

- 1 mg/mL Proteinase K (Sigma)

- MinElute Cleanup Kit (Qiagen)

- mMESSAGE mMACHINE forT3, T7, SP6 polymerase

- 2 U/μl RNase-free DNase (Ambion)

- PolyA Tailing Kit, E.coli (Ambion)

- RNeasy MinElute Cleanup Kit (Qiagen)

- RNase-free 100% EtOH (Wako)

- RNase-free 80% EtOH (Wako)

- RNase-free water (Ambion)

- rRNasin (Promega)

- RNase-free 1.5 and 2.0 mL チューブ

- RNase-free loading バッファー (Ambion)

使用ソフト

- ApE-A Plasmid Editor

- Zen ソフトウェア

- Image J アプリケーション

実験動物

- ddY メスマウス (日本エスエルシー株式会社)

反応液の組成・PCR 条件

表 1. PCR の組成

5×Prime STAR® Buffer	4.0 µL
Prime STAR® HS DNA Polymerase	0.5 µL
Forward Primer (20 µM)	0.2 µL
Reverse Primer (20 µM)	0.2 µL
Template DNA (1 ng/µL)	1.0 µL
dNTP Mixture	1.6 µL
Milli-Q	11.9 µL
合計	20.0 µL

ここで用いた Forward Primer、Reverse Primer については図 2.3、2.4 を参照。

表 2. PCR 条件

Prime Star	1SEG	2SEG (x25)			3SEG	
温度	98 °C	98 °C	55 °C	72 °C	72 °C	10 °C
時間	30 sec	10 sec	5 sec	N min	2 min	∞

N min= (増幅塩基数 bp) ÷ 1000

表 3. PCR 後の制限酵素の組成

Milli-Q	Up to 20 µL
Buffer	N µL
(BSA)	2.0 µL
酵素 X	0.5 µL
酵素 Y	0.5 µL
PCR 産物	10.0 µL
合計	20.0 µL

加えた酵素の種類は図 2.3、2.4 を参照。

BSA の有無やバッファの種類や量などは制限酵素 (Takara) のプロトコルに従って行った。PCR 産物の代わりに既存の cDNA を加える場合は 1.0 µg 加えた。

表 4. Ligation 溶液の組成

Insert	4.0 µL
Vector	1.0 µL
Ligation Mix	5.0 µL
合計	10.0 µL

表 5. コロニー PCR の組成

Milli-Q	Up to 20 μ L
F Primer	0.5 μ L
R Primer	0.5 μ L
Bacteria	1.0 μ L
Go Taq Green Master Mix	10.0 μ L
合計	20.0 μ L

コントロールなどで培養液の代わりに既存の cDNA を加える場合は 1.0 ng 加えた。

F Primer と R Primer のうち片方はベクター上の塩基を読み取る pTNT-SP6_F または T7term-Bam-Xba_R を用いて、もう片方はインサート上の塩基を読み取る Primer を用いた (図 2.3、2.4、2.5)。

表 6. インフュージョンによる PCR 組成

Milli-Q	8.0 μ L
F Primer	0.5 μ L
R Primer	0.5 μ L
Prime STAR Max	10.0 μ L
Template DNA (1 ng/ μ L)	1.0 μ L
合計	20.0 μ L

ここで用いた Forward Primer、Reverse Primer については図 2.5 を参照。

表 7. PCR 条件

Prime Star	1SEG	2SEG (x25)			3SEG	
温度	98 $^{\circ}$ C	98 $^{\circ}$ C	55 $^{\circ}$ C	72 $^{\circ}$ C	72 $^{\circ}$ C	10 $^{\circ}$ C
時間	30 sec	10 sec	5 sec	N sec	2 min	∞

$N \text{ sec} = (\text{増幅塩基数 bp}) \div 200$

表 8. RNA 合成時の制限酵素処理

Milli-Q	Up to 50 μ L
Buffer 10 \times K	5.0 μ L
BamH I	1.25 μ L
cDNA	N μ L
合計	50.0 μ L

BamH I が 2 か所以上切断してしまう場合は Nde I で切断した。

N:cDNA は 5.0 μ g になるように加えた。

表 9. RNA 合成液の組成

10×Reaction Buffer	2.0 μL
2×NTP/CAP	10.0 μL
Enzyme Mix	2.0 μL
Template DNA	N μL
Nuclease free water	Up to 20 μL
合計	20.0 μL

N:テンプレート DNA が 1.0 g になるように加えた。

SIT カメラの測定条件

sensitivity	offset	gain	interval	倍率
Max	Max	Half	30 sec	20 倍

プライマー

Primers	Sequence	Length(bp)
Kpn-hPLC ζ 35_F	AAAGGTACCTGCAGTTATATTCATGTGAAA	30
Kpn-hPLC ζ 68_F	AAAGGTACCACGCACAGAGAAGAAATTATT	30
Kpn-hPLC ζ 103_F	AAAGGTACCGCTGAGATGAGTAAAGCTATT	30
Kpn-hPLC ζ 147_F2	AACGGTACCAAAAATGAATGTAGAAAAGTT	30
hPLC ζ 608_R	TTTGAATTCTCTGACGTACCAAACATAAAC	30
Spe-mPLC ζ 1_F	AAAAGTAGTATGGAAAGCCAACTTCATG	28
mPLC ζ 518-SC-Not_R	TTTGCGGCCGCTTAATGGTCGTCATATTCTGGT	33
Zeta-SC-Not_R	AAAGCGGCCGCTCACTCTCTGAAGTACCAAAC	32
Spe-hPLC ζ 1_F	AAAAGTAGTATGGAAATGAGATGGTTTTTG	30
hPLC ζ 480-SC-Not_R	TTTGCGGCCGCTTACATACCCTCTTTTATGTTACTTG	37
hPLC ζ 608-SC-Not_R	TTTGCGGCCGCTTATCTGACGTACCAAACATAA	33
TAA-Not-Mfe-pGLS_F	TAAGCGGCCGCCAATTGAA	19
mCherry708-Nhe_R	CATGCTAGCCTTGTACAGCTCGTCCATG	28
mCherry-Nhe-Delta_IFF	CTGTACAAGGCTAGCATGGACTCCGGTCGGGAC	33
Delta170-TAA-Not-Mfe_IFR	ATTGGCGGCCGCTTACTTCAGGAAGTCCTTCACC	34
TGA-Not-Mfe-pGLS_F	TGAGCGGCCGCCAATTGAA	19
Zeta503_R	ATCTCTAAGGATGTCTGGCT	20
Zeta503-Delta614_IFF	GACATCCTTAGAGATACCTTCAACTCACGGGCC	33
Delta756-TGA-Not-Mfe_IFR	ATTGGCGGCCGCTCAGTCCTGGATGGAGATCTTC	34